

ANNÉE 2012



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé (VAS)**

présentée par

**Morgane Gicquel**

préparée à l'unité de recherche UMR 6553 (Ecobio)  
(Ecosystèmes – Biodiversité - Evolution)  
(UFR Sciences de la vie et de l'environnement)

**Mécanismes moléculaires  
de la réponse des plantes  
aux radiations ionisantes.  
Exploration du rôle des  
glucosinolates dans la  
réponse antioxydante**

---

**Thèse soutenue à Rennes  
le 14 septembre 2012**

devant le jury composé de :

**Marie-Pascale DOUTRIAUX**

Chargé de Recherche, Université de Paris Sud (IBP Orsay) / *rapporteur*

**Christian MAGNE**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *rapporteur*

**Christian MEYER**

Directeur de recherche, INRA-AgroParisTech (Institut Bourgin, Versailles) / *examineur*

**Jesús Jorrín NOVO**

Professeur, Université de Cordoue / *examineur*

**Marie-Andrée ESNAULT**

Maître de Conférences, Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

**Francisco CABELLO-HURTADO**

Maître de Conférences, Université de Rennes 1 / *co-directeur de thèse*



## **Remerciements**

Mesdames et Messieurs les membres du jury, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail qui ne pourrait avoir de valeur sans votre contribution. Je suis reconnaissante en particulier à Madame Marie-Pascale Doutriaux et Monsieur Christian Magné qui ont accepté la lourde tâche d'être rapporteur.

Je remercie très sincèrement, Marie-Andrée Esnault, directrice de ma thèse, et Francisco « Paco » Cabello-Hurtado, co-encadrant de la thèse, qui forment une équipe efficace et sympathique. J'ai ainsi eu la chance de profiter de leur disponibilité, de leurs conseils et de leur expertise, et surtout ils m'ont offert un soutien moral indéfectible durant ce long travail.

Je remercie les membres de l'équipe MOB (Mécanisme à l'origine de la biodiversité) de l'UMR Ecobio, au sein de laquelle j'ai réalisé ce travail. Leur aide et leurs conseils ont jalonné mon quotidien pendant ces 4 ans.

Je voudrais également exprimer ma gratitude envers les membres du comité de suivi de thèse qui ont contribué par leurs conseils à la cohérence de mes travaux : Madame Odile Sergent et Messieurs Alain Bouchereau, Philippe Simoneau et Denis Michel.

Je remercie également le professeur Jesús V. Jorrín-Novo, directeur du groupe de protéomique du département de biochimie des plantes de l'université de Cordoue, pour son accueil chaleureux au sein de son unité de recherche et pour la transmission de son savoir scientifique et technique. Les trois mois passés en Andalousie ont été un vrai plaisir.

Un grand merci à toutes les petites mains qui ont collaboré aux différentes étapes de la thèse, notamment pour la deuxième partie de ce travail : Elisa Marivin et Kathleen Jarnouen, étudiantes en troisième année de licence, qui ont assuré une partie conséquente des cultures d'*Arabidopsis*. Je remercie Ludovic Valentin, stagiaire de master, qui a fourni un travail considérable et difficile sur les expériences d'apports exogènes sur pois et oignon. De même, je remercie Gwenaël Pause, CDD sur le projet OXYGLU, qui a conduit toutes les mesures de capacité antioxydantes des molécules *in vitro*.

Merci à Anne-Sophie Dumas, ma colocataire de bureau, pour sa sympathie, sa complicité et sa bonne humeur éternelle. Une pensée joyeuse aussi au souvenir du séjour d'Alexandra Marin dans ce même bureau.

Pour finir, je crois que je n'aurais pas pu achever ce travail dans de bonnes conditions sans le soutien de ma famille, mes parents, mes sœurs et mon oncle Jean, de mes amis, et des tangueras & tangueros Rennais : un énorme merci à eux.

Cette thèse a été cofinancée par une allocation de recherche doctorale (211-B2-9/ARED, projet ELODIE) de la Région Bretagne, et par une bourse “Short Term Scientific Mission” (STSM) de l’action EU COST FA0603 “Plant Proteomics in Europe”.

Un petit merci quand même à l’été qui a décidé de commencer en retard cette année afin que je puisse m’atteler à la rédaction sans regret : c’est bon maintenant, tu peux envoyer le soleil !.

## Sommaire

Liste des abbréviations .....	1
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux .....	7
<b>Introduction générale.....</b>	<b>9</b>
1. Contexte.....	10
2. Les radiations ionisantes.....	11
2.1. Définition, types et origines des rayonnements ionisants.....	11
2.2. Effets des radiations ionisantes sur les organismes vivants .....	12
2.2.1. Radiolyse de l'eau et stress oxydant cellulaire.....	12
2.2.2. Interactions rayonnement - biomolécules.....	13
2.3. Effets des radiations ionisantes et réponses observées chez les végétaux.....	14
2.3.1. Notion de radiosensibilité chez les végétaux.....	14
2.3.2. Effets morphologiques.....	14
2.3.3. Réponses au stress oxydant .....	15
2.3.4. Régulations du métabolisme.....	17
2.3.5. Mécanismes de réparation de l'ADN .....	18
3. Les glucosinolates .....	19
3.1. Distribution phylogénétique des glucosinolates dans le règne végétal .....	19
3.2. Structure chimique et voies de biosynthèse.....	20
3.3. Catabolisme des glucosinolates .....	24
3.4. Rôles des glucosinolates dans la plante.....	27
3.4.1. Défense contre les ravageurs .....	27
3.4.2. Rôle dans la nutrition.....	28
3.4.3. Régulation de la croissance et connexions avec le métabolisme de l'auxine	28
3.5. Facteurs influant sur le métabolisme des glucosinolates.....	29
3.5.1. Facteurs abiotiques .....	29
3.5.2. Facteurs biotiques .....	29
3.5.3. Régulations hormonales .....	30
3.6. Effets chimiopréventifs et antioxydants des glucosinolates .....	30
3.7. Diversité génétique inter populations de la voie de biosynthèse des glucosinolates chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>35</b>

1. Matériel végétal .....	36
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	36
1.1.1. Ecotypes naturels .....	36
1.1.2. Mutants de la voie de biosynthèse des glucosinolates.....	36
1.1.3. Suspensions cellulaires .....	37
1.2. Autres modèles végétaux utilisés .....	39
2. Semis et culture des différentes espèces végétales ; complémentation des milieux de culture en glucosinolates et antioxydants.....	39
3. Irradiation des plantes.....	41
3.1. Protocole d'irradiation .....	41
3.2. Temps d'exposition aux RI pour les différentes cultures .....	41
4. Suivi de la croissance racinaire .....	42
5. Echantillonnage, détermination de la masse fraîche et de la masse sèche .....	42
6. Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes.....	43
7. Détection des espèces réactives de l'oxygène par sonde fluorescente .....	43
7.1. Sondes utilisées .....	43
7.2. Infiltration de la sonde sur cultures racinaires.....	43
7.3. Microscopie et photographie .....	44
8. Extraction et quantification des glucosinolates du chou-fleur.....	44
9. Détermination de la capacité antioxydante <i>in vitro</i> des glucosinolates.....	45
9.1. Méthode de détermination à l'ABTS.....	45
9.2. Méthode de détermination au DPPH.....	46
9.3. Méthode ORAC (« oxygen radical absorbance capacity ») .....	46
9.4. Méthode SRSA (« superoxide radical scavenging activity »).....	47
9.5. Production des EHDPS (« enzymatic hydrolysis-derived products ») .....	47
10. Dosage des activités enzymatiques antioxydantes chez <i>A. thaliana</i> et <i>A. cepa</i> .....	47
10.1. Extraction des protéines solubles .....	47
10.2. Dosage des protéines .....	48
10.3. Mesure de l'activité gaïacol peroxydase (GPX).....	48
10.4. Dosage de l'activité glutathion réductase (GR).....	49
10.5. Dosage de l'activité superoxyde dismutase (SOD) .....	49
11. Traitement statistique des données .....	50
12. Etude protéomique.....	50
12.1. Echantillons et cinétiques .....	51

12.2. Extraction et quantification des protéines .....	51
12.3. Electrophorèse bidimensionnelle.....	52
12.4. Analyse comparative des gels .....	52
12.5. Analyse statistique .....	53
12.6. Identification des protéines.....	53
12.7. Exploration et analyse des résultats.....	54
13. Etude de transcriptomique .....	55
13.1. Conditions de cultures, irradiations et cinétiques de réponse.....	55
13.2. Extraction des ARN.....	55
13.3. Réalisation de la puce à ADN et des hybridations .....	55
13.4. Analyse statistique des données de puce à ADN.....	56
13.5. Exploration et analyse des résultats.....	57
14. Bases de données utilisées pour l'analyse des données de génomique fonctionnelle	57
14.1. Interaction protéine-protéine prédites in Silico .....	57
14.2. Interactions protéine-protéine confirmées expérimentalement .....	57
14.3. Co-expressions transcriptomiques.....	58
<b>Chapitre 1 : Conséquences biologiques des radiations ionisantes sur <i>A. thaliana</i> ;</b>	
<b>impacts sur le protéome et le transcriptome.....</b>	<b>59</b>
1. Effets des radiations ionisantes sur la santé de la plante en fonction de la dose et du	
stade de développement .....	62
1.1. Effets des radiations ionisantes sur les plantules d' <i>A. thaliana</i> au stade	
« émergence de l'hypocotyle et des cotylédons » .....	62
1.1.1. Effets de l'irradiation sur le cycle reproductif.....	62
1.1.2. Effets de l'irradiation sur la croissance des plantes.....	63
1.1.3. Effets de l'irradiation sur les teneurs en pigments photosynthétiques .....	65
1.2. Effets des radiations ionisantes sur les plantules d' <i>A. thaliana</i> au stade « 2 feuilles	
vraies » .....	66
1.2.1. Effets de l'irradiation sur le cycle reproductif.....	66
1.2.2. Effets de l'irradiation sur la croissance des plantes.....	67
1.2.3. Effets de l'irradiation sur les teneurs en pigments photosynthétiques .....	69
1.3. Détection de la production de ROS dans les racines suite à l'irradiation .....	69
1.4. Discussion.....	70
2. Effets des radiations ionisantes sur le protéome d' <i>A. thaliana</i> .....	74
2.1. Introduction .....	74

2.2. Résumé .....	74
2.3. Article : « Application of proteomics to the assessment of the response to ionising radiation in <i>Arabidopsis thaliana</i> » .....	76
2.4. Conclusion .....	91
3. Effets des radiations ionisantes sur le transcriptome d' <i>A. thaliana</i> .....	95
3.1. Introduction .....	95
3.2. Résumé .....	96
3.3. Article : « Kinetic transcriptomic approach revealed metabolic pathways and genotoxic-related changes implied in the Arabidopsis response to ionising radiations » .....	97
3.4. Conclusion .....	112
4. Discussion et conclusion du chapitre 1.....	116
<b>Chapitre 2 : Evaluation des capacités antioxydantes des glucosinolates et de leur implication dans la protection des plantes face aux effets pro-oxydants des radiations</b>	<b>120</b>
1. Etude de la capacité antioxydante <i>in vitro</i> des glucosinolates.....	123
1.1. Introduction .....	123
1.2. Résumé .....	123
1.3. Article : « Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower ( <i>Brassica oleracea</i> ) from a glucosinolate content perspective ».....	125
1.4. Conclusion.....	133
2. Effets d'un apport en glucosinolates lors de la réponse aux radiations ionisantes chez des espèces productrices ou non de glucosinolates .....	134
2.1. Apports exogènes de glucosinolates et dérivés en fortes concentrations chez <i>A. thaliana</i> .....	135
2.1.1. Effets d'un apport en sinigrine .....	135
2.1.2. Comparaison de l'effet de la sinigrine et de deux dérivés, l'AITC et l'I3C .....	137
2.2. Apports exogènes de glucosinolates en faibles concentrations chez <i>A. thaliana</i> .....	140
2.2.1. Effet des molécules ajoutées au milieu de culture.....	141
2.2.2. Effet des molécules après irradiation.....	144
2.3. Effets des faibles doses en différents glucosinolates et dérivés chez des plantes non productrices de glucosinolates .....	145
2.3.1. Effets des radiations ionisantes sur le développement de <i>P. sativum</i> et <i>A. cepa</i> .....	145
2.3.2. Effets des glucosinolates sur le développement des plantes de <i>P. sativum</i> et d' <i>A. cepa</i> soumises aux radiations ionisantes .....	147



2.3.3. Modulation par les glucosinolates des activités enzymatiques antioxydantes en réponse aux radiations ionisantes .....	150
2.3.4. Bilan des apports exogènes en glucosinolates sur des plantes non productrices .....	153
3. Relation entre les teneurs en glucosinolates endogènes et la réponse à l'irradiation	156
3.1. Comparaison des effets des radiations ionisantes sur les marqueurs morphologiques d'un panel d'écotypes d' <i>A. thaliana</i> .....	156
3.2. Comportement de mutants de la voie de biosynthèse des glucosinolates chez <i>A. thaliana</i> .....	160
3.3. Effet de l'irradiation sur les enzymes antioxydantes du mutant <i>sur1</i> (Col-0).....	162
3.3. Discussion.....	164
4. Discussion.....	168
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>172</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>175</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>194</b>
Liste des annexes .....	195



## Liste des abréviations

2D-E = électrophorèse bidimensionnelle

2,4-D = 2,4-dichloro-phénoxyacétique

AAPH = 2,2'-azobis[2-amidinopropane] dihydrochloride

ABTS = diammonium 2,2'-azino-bis(3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonate)

ACC = acide 1-aminocyclopropane 1-carboxylique

ADN = acide désoxyribonucléique

AIA = acide indolyl-3-acétique

*angl.* = traduit de l'anglais

ANOVA = analyse de variance

APX = ascorbate peroxydase

ASC = aire sous la courbe

BAP = benzylaminopurine

CAT = catalase

CT = échantillon contrôle non irradié (nomenclature pour l'étude transcriptomique : CT-2h et CT-26h)

cv = cultivar

dNT = désoxyribonucléotide

DHAR = déhydroascorbate réductase

DO = densité optique

DPPH = 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

DSB = *angl.* « *double strand break* », cassure double brin

EHDP = *angl.* « *enzymatic hydrolysis-derived product* »

ESP = *angl.* « *epithiospecifier protein* », protéine épithio-spécifique

ER = *angl.* « *endoplasmic reticulum* »

CYP = enzymes à cytochrome P450

GLL = GDSL lipase-like

GLS = glucosinolate

G<sub>6</sub>PDH = glucose 6-P déshydrogénase

GPX = gaïacol peroxydase

GR = glutathion réductase

GST = *angl.* « *gene-specific sequence tags* »

HPLC = chromatographie en phase liquide à haute performance  
HSP = *angl.* « *heat-shock protein* »  
IEF = électrofocalisation  
IR10 = échantillon irradié à la dose 10 Gy (nomenclature pour l'étude transcriptomique :  
IR10-2h et IR10-26h)  
IR40 = échantillon irradié à la dose 40 Gy (nomenclature pour l'étude transcriptomique :  
IR40-2h et IR40-26h)  
ITC = isothiocyanate  
JA = *angl.* « *jasmonic acid* », acide jasmonique  
JAL = *angl.* « *jacalin-related lectin* »  
j.a.t. = jours après traitement  
KW = test de comparaison multiple des moyennes de Kruskal-Wallis  
M&M = matériel et méthodes  
MeJA = *angl.* « *methyl jasmonic acid* », jasmonate de méthyle  
MIPS = *angl.* « *Munich Information Center for Protein Sequences* »  
MF = masse fraîche  
MS = masse sèche  
NAA = *angl.* « *1-naphthaleneacetic acid* », acide naphthalène acétique  
NBT = *angl.* « *nitro blue tetrazolium* », sulfate de méthyl p-Nitrotétrazonium  
NSP = *angl.* « *nitrile specifier protein* », protéine nitrile-spécifique  
ORAC = *angl.* « *oxygen radical absorbance capacity* »  
*p-anova* = p-value obtenue lors de l'analyse de variance  
PCD = *angl.* « *programmed cell death* », mort cellulaire programmée  
*p-kw* = p-value obtenue lors du test de Kruskal-Wallis  
PER = peroxydase  
PSII = photosystème II  
RI = radiations ionisantes  
ROS = *angl.* « *reactive oxygen species* », dérivés réactifs de l'oxygène  
SA = *angl.* « *salicylic acid* », acide salicylique  
SEM = erreur type de la moyenne  
SOD = superoxyde dismutase  
SRSA = *angl.* « *superoxide radical scavenging activity* »  
SSC = *angl.* « *saline-sodium citrate* »  
Sv = sievert

TE = *angl.* « *Trolox equivalent* », équivalent trolox

TEL = transfert d'énergie linéaire

TFA = *angl.* « *trifluoroacetic acid* », acide trifluoroacétique

TFP = *angl.* « *thiocyanate-forming protein* », protéine thiocyanate-formatrice

UGT = UDP-glucosyl transférase

WT = *angl.* « *Wild Type* », type sauvage ou naturel



### Liste des figures

- Figure 1 – Cascade des réactions consécutives à la radiolyse de l'eau et production de dérivés réactifs de l'oxygène dans une cellule vivante d'après Tubiana *et al.* 2008. p.13.
- Figure 2 – Voies possibles de l'élimination des espèces radicalaires produites suite à l'exposition de la cellule aux radiations ionisantes par les activités antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques. p.17.
- Figure 3 – Phylogénie de l'ordre des Brassicales et illustrations d'espèces d'intérêt économique de la famille des Brassicaceae. p.20.
- Figure 4 – Structure chimique et étapes de la voie de biosynthèse des glucosinolates, d'après Grubb et Abel, 2006. p.22.
- Figure 5 – Hydrolyse enzymatique des glucosinolates, d'après Burow *et al.* 2009. p.24.
- Figure 6 – Connexion métabolique et inter régulation entre la voie de biosynthèse des glucosinolates indoliques et la voie de biosynthèse de l'auxine. p.29.
- Figure 7 – Polymorphisme génétique de la voie de biosynthèse et d'hydrolyse des glucosinolates chez *A. thaliana* d'après Kliebenstein *et al.* 2001 et Lambrix *et al.* 2001. p.33.
- Figure 8 – Mutants de la voie de biosynthèse des glucosinolates caractérisés chez *A. thaliana* et utilisés dans la thèse (d'après Nafisi *et al.* 2006, avec modifications). p.37.
- Figure 9 – Cultures de cals et suspensions cellulaires d'*A. thaliana*. p.38.
- Figure 10 – Cultures en conditions stériles et contrôlées des différents modèles biologiques. p.42.
- Figure 11 – Aspect morphologique des plantules d'*A. thaliana* (Col-0) au stade de développement 0.7 et vingt-cinq jours après irradiation à ce stade. p.63.
- Figure 12 – Masses fraîches (A) et masses sèches (B) des parties aériennes de plantules d'*A. thaliana*, écotypes Col-0 et *Ler*, dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. p.64.
- Figure 13 – Longueur en mm de la racine primaire des plantules d'*A. thaliana*, écotypes Col-0 (A) et *Ler* (B), après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. p.65.
- Figure 14 – Teneurs en chlorophylles totales (A) et en caroténoïdes (B) chez *A. thaliana*, écotypes Col-0 et *Ler* dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. p.66.
- Figure 15 – Aspect morphologique des plantules d'*A. thaliana* (Col-0) au stade de développement 1.02 et vingt-cinq jours après irradiation à ce stade. p.67.
- Figure 16 – Masses fraîches des parties aériennes (A) et des racines (B) de plantules d'*A. thaliana*, écotypes Col-0 et *Ler*, sept jours après exposition à des doses de radiations ionisantes de 10 Gy et 40 Gy. p.68.
- Figure 17 – Longueur en mm de la racine primaire des plantules d'*A. thaliana*, écotypes Col-0 (A) et *Ler* (B), après exposition à des doses de radiations ionisantes de 10 Gy et 40 Gy. p.68.
- Figure 18 – Teneurs en chlorophylles totales (A) et en caroténoïdes (B) chez *A. thaliana*, écotypes Col-0 et *Ler*, sept jours après exposition à des doses de radiations ionisantes de 10 Gy et 40 Gy. p.69.
- Figure 19 – Photographies dans le visible et en fluorescence (photo présentée en négatif pour un meilleur contraste) de racines infiltrées avec la sonde DCH<sub>2</sub>F-DA et irradiées à 10 Gy ou 40 Gy. p.70.

- Figure 20 – Inhibition de la croissance racinaire d'*A. thaliana* après exposition à différentes doses de radiations ionisantes appliquées au stade de développement 0.7, exprimée en % par rapport aux plantes contrôles non irradiées. p.71.
- Figure 21 – Schéma récapitulatif des régulations du protéome observées après des irradiations de 10 Gy et 40 Gy chez *A. thaliana*. p.92.
- Figure 22 – Schéma récapitulatif des régulations transcriptomiques observées après des irradiations de 10 Gy et 40 Gy chez *A. thaliana*. p.115.
- Figure 23 – Paramètres relatifs aux plantules d'*A. thaliana*, 10 jours après exposition à une dose de 40 Gy appliquée au stade 0.7, en fonction de la concentration en sinigrine apportée dans le milieu de culture. p.136.
- Figure 24 – Masse sèche par plante (A) et longueurs des racines primaires (B), dix jours après irradiation à la dose 40 Gy, en fonction de l'apport en Sinigrine, AITC et I3C chez *A. thaliana* écotype Col-0. p.138.
- Figure 25 – Teneurs en chlorophylles (A) et caroténoïdes (B), dix jours après irradiation à la dose 40 Gy, en fonction de l'apport en Sinigrine, AITC et I3C chez *A. thaliana* écotype Col-0. p.139.
- Figure 26 – Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* après 4 jours de culture (stade d'irradiation) en fonction de la concentration du milieu en différentes molécules. p.142.
- Figure 27 – Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* au 14<sup>ème</sup> jour de culture en fonction de l'irradiation et de la concentration du milieu en différentes molécules. p.143.
- Figure 28 – Masses fraîches des parties aériennes et des racines des plantules de *Pisum sativum* cv *Baccara* âgées de 8 jours selon la dose d'irradiation. p.146.
- Figure 29 – Photographies de pois (*Pisum sativum* cv *Baccara*) âgés de 8 jours et irradiés à des doses de 0, 15 et 40 Gy au quatrième jour de culture. p.146.
- Figure 30 – Masses fraîches des parties aériennes et des racines d'*Allium cepa* âgées de 17 jours selon la dose d'irradiation. p.147.
- Figure 31 – Photographies comparatives des bulbes et racines d'*Allium cepa* âgés de 19 jours et irradiés à des doses de 0 et 10 Gy au huitième jour de culture. p.147.
- Figure 32 – Activités de la gaïacol peroxydase et de la glutathion réductase dans les parties aériennes et dans les racines de plantules d'*Allium cepa* âgées de 17 jours soumises à différentes doses d'irradiation. p.150.
- Figure 33 – Activités de la gaïacol peroxydase et de la glutathion réductase dans les parties aériennes et les racines d'*Allium cepa* pour différentes concentrations du milieu en ascorbate. p.151.
- Figure 34 – Activités de la gaïacol peroxydase et de la glutathion réductase dans les parties aériennes et les racines d'*Allium cepa* pour différentes concentrations du milieu en sinigrine. p.152.
- Figure 35 – Activités de la gaïacol peroxydase et de la glutathion réductase dans les parties aériennes et les racines d'*Allium cepa* pour différentes concentrations du milieu en indole-3-carbinol. p.153.
- Figure 36 – Masse fraîche des parties aériennes des plantules d'*A. thaliana* dix jours après irradiation en fonction de la dose d'irradiation et de l'écotype. p.157.
- Figure 37 – Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* sept jours après irradiation en fonction de la dose d'irradiation et de l'écotype. p.158.
- Figure 38 – Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* dix jours après irradiation en fonction de la dose d'irradiation et de l'écotype. p.159.



- Figure 39 – Masses fraîches et masses sèches des parties aériennes de plantules d'*A. thaliana*, écotype WT (Col-0), mutants *sur1*(Col-0) et *myb28*(Col-0), dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. p.160.
- Figure 40 – Masses fraîches et masses sèches des parties aériennes de plantules d'*A. thaliana*, écotype WT(Ws) et double mutant *cyp79B2B3*(Ws), dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. p.161.
- Figure 41 – Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana*, écotype Col-0, mutants *sur1*(Col-0) et *myb28*(Col-0), sept jours et dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. p.161.
- Figure 42 – Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana*, écotype Ws et double mutant *cyp79B2B3*(Ws), sept jours et dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. p.162.
- Figure 43 – Photographies de plantules d'*A. thaliana* écotype Col-0 WT et mutant *sur1*(Col-0) au 17<sup>ème</sup> jour de culture après irradiation ou non au stade de développement 1.02. p.163.
- Figure 44 – Activités enzymatiques gaïacol peroxydase (GPX), glutathion réductase (GR) et superoxyde dismutase (SOD) dans les parties aériennes de plantules d' *A. thaliana* sept jours après exposition à une dose de radiations ionisantes de 40 Gy chez l'écotype Col-0 sauvage (WT) et chez le mutant *sur1*(Col-0). p.164.
- Figure 45 – Masse sèche par plante, longueurs des racines primaires, teneurs en chlorophylles et teneurs en caroténoïdes, dix jours après irradiation à la dose 40 Gy, en fonction de l'apport en Sinigrine, AITC et I3C chez *A. thaliana* écotype *Ler* (Annexe n° 3). p.226.
- Figure 46 – Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* au 11<sup>ème</sup> jour de culture en fonction de l'irradiation et de la concentration du milieu en différentes molécules (Annexe n° 4). p.228.
- Figure 47 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes et des racines en fonction de la concentration en ascorbate du milieu de culture chez *Pisum sativum* et *Allium cepa* (Annexe n° 6). p.230.
- Figure 48 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes et des racines en fonction de la concentration en sinigrine du milieu de culture chez *Pisum sativum* et *Allium cepa* (Annexe n° 6). p.230.
- Figure 49 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes et des racines en fonction de la concentration en glucobrassicine du milieu de culture chez *Pisum sativum* et *Allium cepa* (Annexe n° 6). p.231.
- Figure 50 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes et des racines en fonction de la concentration en indole-3-carbinol du milieu de culture chez *Pisum sativum* et *Allium cepa* (Annexe n° 6). p.231.
- Figure 51 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes et des racines en fonction de la concentration en glucotropaeoline du milieu de culture chez *Pisum sativum* et *Allium cepa* (Annexe n° 6). p.232.
- Figure 52 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes et des racines en fonction de la concentration en gluconapine du milieu de culture chez *Allium cepa* (Annexe n° 6). p.232.

## Liste des tableaux

- Tableau 1 – Gènes impliqués dans la biosynthèse des glucosinolates chez *A. thaliana*. p.23.
- Tableau 2 – Gènes impliqués dans l'hydrolyse enzymatique des glucosinolates chez *A. thaliana*. p.26.
- Tableau 3 – Nomenclature des stades de développement chez *A. thaliana* d'après Boyes *et al.* (2001). p.36.
- Tableau 4 – Liste des molécules apportées dans les milieux de culture lors des expériences d'apports exogènes. p.40.
- Tableau 5 – Temps d'expositions aux radiations ionisantes appliqués en fonction de l'espèce végétale considérée. p.42.
- Tableau 6 – Résultats majeurs reflétant les effets des RI sur la croissance de Col-0 et *Ler* exprimés en pourcentage de perte de masse ou de longueur racinaire (d'après les données présentées dans les Figures 12 à 14 et 16 à 18). p.71.
- Tableau 7 – Récapitulatif des interactions, réelles et prédites, et des co-expressions données pour les protéines RACK1A, RACK1B, RACK1C, CSP41B et emb1796. p.94.
- Tableau 8 – Récapitulatifs des expériences d'apport exogènes menées sur les trois modèles végétaux. p.135.
- Tableau 9 – Statistiques relatives aux marqueurs étudiés chez *A. thaliana*, écotype Col-0 lors des expériences d'apports exogènes en sinigrine, AITC et I3C. p.140.
- Tableau 10 – Effets des GLSs et des molécules antioxydantes et pro-oxydantes sur la croissance racinaire d'*A. thaliana* en l'absence d'irradiation. p.144.
- Tableau 11 – Récapitulatif des effets observés sur le développement de *P. sativum* et *A. cepa* lors des expériences d'apport exogènes en fonction de l'irradiation et des concentrations apportées en molécules. p.148.
- Tableau 12 – Classement des moyennes des masses fraîches des parties aériennes des plantules d'*A. thaliana* 10 jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes en fonction de l'écotype. p.157.
- Tableau 13 – Classement des moyennes des longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* sept et dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes en fonction de l'écotype. p.159.
- Tableau 14 – Effets positifs et négatifs des radiations ionisantes sur le développement des plantules de différents écotypes naturels d'*A. thaliana* sept et dix jours après exposition à différentes doses d'irradiation. p.165.
- Tableau 15 – Teneurs relatives (%) en glucosinolates dans les feuilles de plantules de trois semaines et dans les graines de certains écotypes naturels d'*A. thaliana* mesurés par Kliebenstein *et al.* 2001a. p.166.
- Tableau 16 – Effets positifs et négatifs des radiations ionisantes sur le développement des plantules de différents mutants d'*A. thaliana* sept et dix jours après exposition à différentes doses d'irradiation. p.167.
- Tableau 17 – Statistiques relatives aux marqueurs étudiés chez *A. thaliana*, écotype *Ler* lors des expériences d'apports exogènes en sinigrine, AITC et I3C (Annexe n° 3). p.227.
- Tableau 18 – Résultats des tests anovas à 2 facteurs (apport en molécule x irradiation) pour les expériences d'apports exogènes sur *A. thaliana* (Annexe n° 5). p.229.

Tableau 19 – Teneurs en familles de glucosinolates dans les feuilles de plantules de trois semaines et dans les graines de certains écotypes naturels d'*A. thaliana* mesurés par Kliebenstein *et al.* 2001a (Annexe n° 7). p.233.

Tableau 20 – Teneurs en certains glucosinolates particuliers dans les feuilles de plantules de trois semaines et dans les graines de certains écotypes naturels d'*A. thaliana* mesurés par Kliebenstein *et al.* 2001a (Annexe n° 7). p.233.



## *Introduction générale*

---



## 1. Contexte

Tous les organismes terrestres sont exposés à des faibles doses de radiations ionisantes (RI) qui peuvent être d'origine naturelle (rayonnements telluriques ou cosmiques) ou liées aux activités humaines (énergie nucléaire, radio-imagerie, radiothérapie, applications industrielles par exemple). Les effets majeurs de ces rayonnements sont dus aux attaques sur la molécule d'ADN et à la radiolyse de l'eau. Cette radiolyse génère un stress oxydant très important via la production rapide de radicaux libres, point de départ de nombreuses perturbations cellulaires. Les RI constituent donc un modèle pertinent pour la recherche de molécules antioxydantes qui font l'objet d'un intérêt croissant, non seulement pour la protection contre les effets de ces rayonnements, mais aussi pour limiter les effets des autres stress auxquels les organismes sont soumis. En effet, la plupart d'entre eux génère également un stress oxydant, responsable notamment du vieillissement cellulaire.

Du fait de leur caractère sessile, les végétaux sont particulièrement exposés à différentes sources de stress contre lesquels ils ont développé des stratégies de défense. Ils font donc l'objet de nombreux travaux à la fois pour l'étude des effets du stress oxydant et pour la recherche de molécules antioxydantes. C'est dans ce contexte que la région Bretagne a soutenu ce travail. Effectivement, parmi les molécules antioxydantes potentielles, les glucosinolates sont bien présents dans les productions végétales bretonnes. Il s'agit d'une classe de molécules issues du métabolisme secondaire, présentes majoritairement chez les Brassicaceae qui rassemblent, entre autres, tous les choux. La Bretagne est en effet, la première région légumière française et la 6<sup>ème</sup> en Europe<sup>1</sup>. Parmi les 556 000 tonnes de légumes frais produits en 2010, 269 173 concernaient la production de choux-fleurs, 10 303 les choux brocolis et environ 4 000 les choux romanescos et choux-fleurs de couleur. Les choux font également l'objet de la majorité des exportations (145 000 sur les 191 000 tonnes exportées)<sup>1</sup>. Une partie de la production est orientée vers la transformation. Il reste toutefois, après les cultures ou la transformation, des co-produits invendus tels que les feuilles et les tiges qui pourraient faire l'objet d'une valorisation. Ainsi, l'extraction de molécules spécifiques, comme les GLSs, pourraient constituer un débouché intéressant. Les GLSs sont déjà connus pour leurs effets bénéfiques en nutrition humaine et leurs propriétés anticancéreuses (Cartea et Velasco 2008) mais ils n'ont jamais été testés pour leurs propriétés antioxydantes.

---

<sup>1</sup> <http://www.cerafel.com>

L'objectif de ce travail était donc double. Il s'agissait d'étudier les effets des radiations ionisantes d'une part et d'évaluer le rôle des glucosinolates d'autre part en testant l'hypothèse d'un rôle antioxydant des glucosinolates sur un modèle végétal. La plante modèle *Arabidopsis thaliana*, qui appartient à la même famille que le chou, a été retenue pour la recherche de marqueurs des effets des radiations au niveau de son développement et au niveau moléculaire afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation métabolique impliqués dans la réponse des plantes. Les résultats obtenus feront l'objet du premier chapitre consacré aux résultats. Dans un deuxième temps, un rôle possible des glucosinolates (GLSs) dans la réponse antioxydante a été recherché et fera l'objet du second chapitre.

## 2. Les radiations ionisantes

### 2.1. Définition, types et origines des rayonnements ionisants

Un rayonnement est dit « ionisant » lorsque l'énergie cinétique de ses particules est suffisante pour ioniser les atomes ou les molécules, c'est à dire supérieure à 10 électron-volt (eV)<sup>2</sup> ce qui correspond grossièrement à l'énergie de liaison des électrons les moins retenus. Ces rayonnements de haute énergie sont donc capables d'arracher un électron aux atomes rencontrés. Ce sont ces ionisations et excitations induites le long de leur trajectoire qui sont à l'origine de leurs effets biologiques néfastes sur les organismes. Leur pénétration est variable selon la nature du rayon qui peut être particulaire (chargées ou neutre) ou électromagnétique, et selon la nature et l'épaisseur de la matière rencontrée. Leur atténuation se fait par perte d'une fraction importante de leur énergie à chaque collision.

Dans le contexte des rayonnements naturels, on distingue deux types de rayonnements ionisants :

**(a)** Les rayonnements corpusculaires chargés,  $\beta^-$ ,  $\beta^+$  ou  $\alpha$ , proviennent d'éléments instables au niveau du noyau car ils comportent un excédent de neutrons et/ou de protons. Pour retrouver leur stabilité, ils émettent selon le cas un électron négatif ( $\beta^-$ ), un électron positif aussi appelé positron ( $\beta^+$ ) ou un noyau d'hélium ( ${}^4_2\text{He}$ , rayonnement  $\alpha$ ). Ces rayonnements ont une faible portée dans l'air (de quelques cm jusqu'à 8 m). Leur pénétration dans les tissus vivants, variable selon leur énergie, est relativement faible.

**(b)** Les rayonnements X ou  $\gamma$ , sont des ondes électromagnétiques neutres de nature photonique, mais dont l'origine diffère. Les rayons  $\gamma$  sont émis lors du réarrangement des noyaux après désintégration  $\beta^-$ ,  $\beta^+$  ou  $\alpha$  (évacuation de l'excès d'énergie). Les rayons X,

---

<sup>2</sup> 1eV = 1,60217653 × 10<sup>-19</sup> joule



utilisés dans le présent travail, sont généralement produits par des transitions suite à une perturbation dans le cortège électronique qui peuvent être dues à la collision avec un électron accéléré, comme c'est le cas dans un générateur, ou avec une particule  $\beta$ . Les photons étant des particules sans masse, les rayons  $\gamma$  et X sont très pénétrants, notamment dans la matière peu dense que sont les tissus vivants. Il faut plusieurs cm de matière dure pour les arrêter (écrans de protection en plomb ou du béton).

Les organismes terrestres sont exposés à un rayonnement radioactif naturel de faible intensité qui est dû aux rayonnements cosmiques (solaire notamment) et telluriques. Parmi ces derniers, on peut citer les éléments de filiation de l'uranium 238 dont le radon, gaz émis notamment au niveau des roches granitiques comme en Bretagne.

L'unité utilisée pour évaluer l'effet biologique des radiations ionisantes est le gray (Gy) qui correspond à une énergie reçue par unité de masse (joules par kg). Celle-ci peut être transformée en sievert (Sv) pour corriger les différences d'impact biologique entre les types de rayonnements. Il correspond alors à un équivalent de dose. Dans le cas des rayonnements X utilisés ici, le facteur de correction est de 1 ; en conséquence un gray correspond à un sievert.

## ***2.2. Effets des radiations ionisantes sur les organismes vivants***

### *2.2.1. Radiolyse de l'eau et stress oxydant cellulaire*

Les radiations ionisantes provoquent un stress oxydant quasi instantané dans les cellules vivantes, c'est à dire la production d'une quantité importante de radicaux libres, par le mécanisme de la radiolyse de l'eau. En effet, elles arrachent un électron aux molécules d'eau qu'elles rencontrent, ce qui génère en premier lieu la production d'un «électron aqueux», espèce radicalaire propre aux radiations, et d'un radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ) très agressif. Ces deux radicaux génèrent par la suite des espèces radicalaires secondaires, tels que les radicaux superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), perhydroxyde ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) par des réactions aléatoires en chaîne (Figure 1). Ces espèces chimiques sont regroupées sous l'appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » (ROS pour *angl.* « *reactive oxygen species* »).

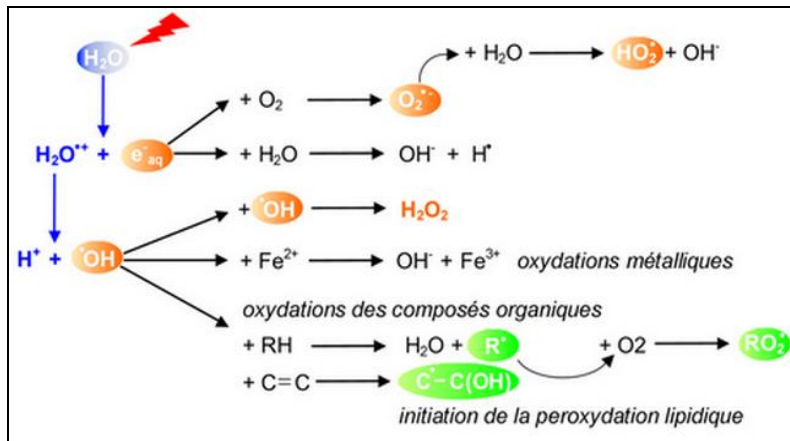


Figure 1 – Cascade des réactions consécutives à la radiolyse de l'eau et production de dérivés réactifs de l'oxygène dans une cellule vivante d'après Tubiana *et al.* 2008.

A partir de ce phénomène bien documenté (Tubiana *et al.* 2008), ce sont les interactions des espèces radicalaires produites avec les biomolécules qui constituent les effets dits « indirects » des radiations ionisantes, causant par la suite des dommages structuraux et fonctionnels dans la cellule. On observe notamment la production de peroxydes organiques au niveau des membranes par dé-estérification des phospholipides (Voisine *et al.* 1993). La peroxydation lipidique est d'ailleurs un des marqueurs les plus utilisés pour évaluer les dégâts cellulaires lors des recherches pour l'amélioration des traitements en radiothérapie (Gupta *et al.* 2010 ; Ismail *et al.* 2010). Les ROS induisent également des changements de conformation et des dénaturations des protéines (Saloua *et al.* 2011) et des molécules d'ADN. Le radical  $^{\bullet}OH$  attaque notamment l'ADN en arrachant un atome d'hydrogène au désoxyribose ou aux bases ou en s'additionnant sur les double liaisons de certaines bases, le résultat final de ces réactions étant la formation de cassures de brins, de sites abasiques ou de modifications de bases et de sucres (Tubiana *et al.* 2008 ; Spothem-Maurizot et Davídková 2011).

### 2.2.2. Interactions rayonnement - biomolécules

En plus des effets des ROS, les protéines et l'ADN sont également la cible directe des radiations par un dépôt d'énergie sur les molécules qui provoque des excitations et des ionisations. L'importance des effets directs par rapport aux effets indirects dépend de la nature des radiations : les particules  $\alpha$  qui ont une forte valeur de « transfert d'énergie linéaire » (TEL, quantité d'énergie déposée le long de la trajectoire) induisent une proportion plus importante d'effets directs que les radiations  $\beta$  ou  $\gamma$  qui possède une TEL plus faible (Goodhead et Nikjoo 1989). Les effets directs causent également des lésions au niveau du désoxyribose, des altérations ou des délétions de bases, des pontages inter brins ou ADN-protéines, et des ruptures simple ou double brin (Tubiana *et al.* 2008 ; Spothem-Maurizot et

Davidková 2011). Les effets des RI sur l'ADN sont la cause essentielle à l'origine des pouvoirs stochastique et mutagène des radiations.

### **2.3. Effets des radiations ionisantes et réponses observées chez les végétaux**

#### *2.3.1. Notion de radiosensibilité chez les végétaux*

La radiosensibilité des végétaux dépend dans un premier temps de l'espèce étudiée et de la dose. La notion de faible dose est définie comme la dose en dessous de laquelle l'organisme développe des mécanismes de réparation et de détoxification efficaces qui lui permettront de rétablir un l'équilibre cellulaire et de survivre au stress subi (Chenal *et al.* 2000). Ce sont les conditions dans lesquelles nous nous sommes placées. Cependant cette notion peut être très différente selon le type d'organisme étudié. Les végétaux montrent une radiorésistance bien plus élevée que les animaux, grâce notamment, au développement d'un métabolisme secondaire important (plus de 45000 molécules) qui leur permet de lutter contre les agressions biotiques ou abiotiques de leur environnement. Alors qu'une irradiation du corps entier à une dose de 8 Gy est mortelle à 90% chez l'homme (IAEA 1998 ; Tubiana *et al.* 2008), les plantules d'*A. thaliana* supportent une irradiation de 40 Gy et finissent leur cycle de développement normalement après cette exposition. A titre de comparaison, le petit pois (*Pisum sativum*) arrête définitivement son développement suite à cette même dose (Zaka *et al.* 2004). Par ailleurs, le stade d'irradiation joue également un rôle important au niveau de l'effet et de la réponse de la plante. Par exemple, l'importance de la radiolyse de l'eau provoquée par les RI est reliée à la teneur en eau, qui varie au cours du développement (Kurimoto *et al.* 2010 ; Vandenhove *et al.* 2010). Pour des plantes en croissance, les doses généralement utilisées sont de l'ordre de la dizaine ou la centaine de Gy. Par contre, il est courant d'utiliser des doses de l'ordre du kGy lors de l'irradiation de graines sèches qui sont des structures de résistance, leur faible teneur (voir absence) en eau participant, entre autre, à leur radio résistance. D'autre part, les organes contenant des zones de division cellulaire (mitose, méiose) sont plus sensibles et les effets des RI y transparaissent rapidement.

#### *2.3.2. Effets morphologiques*

L'effet visible le plus souvent observé chez les plantes après irradiation est le retard ou l'arrêt de la croissance. Celui-ci est plus ou moins important selon la dose appliquée et se répercute sur les biomasses ou les dimensions des organes. Ainsi, des réductions de la masse sèche ont été observées après une irradiation de 10 Gy chez *P. sativum*, ou de 20 Gy chez une Poaceae, *Holcus lanatus* (houlque laineuse ; Jones *et al.* 2004) et chez *Capsicum annuum*

(poivre rouge ; Kwon *et al.* 2001). Une dose de 200 Gy inhibe également la croissance chez le tabac *Nicotiana tabacum*. De ce point de vue, les racines sont généralement plus sensibles que les parties aériennes et peuvent notamment mettre en évidence l'effet de très faibles doses d'irradiations chroniques (Vandenhove *et al.* 2010). Elles seraient donc un bon marqueur des RI et leur capacité à réagir à de très faibles doses est aussi utilisée pour étudier les effets des ondes électromagnétiques non ionisantes émises par les téléphones mobiles (Sharma *et al.* 2009). Chez *A. thaliana*, un arrêt momentané de la croissance a été observé pour des doses de 50 à 150 Gy selon les conditions (Culligan *et al.* 2006 ; Kurimoto *et al.* 2010). A des doses plus élevées, certains symptômes supplémentaires peuvent apparaître, comme la formation de nouveaux trichomes et poils racinaires ou l'expansion radiale des cellules racinaires. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ces modifications résulteraient de processus liés à la voie de signalisation des ROS (Nagata *et al.* 2005 ; De Micco *et al.* 2010).

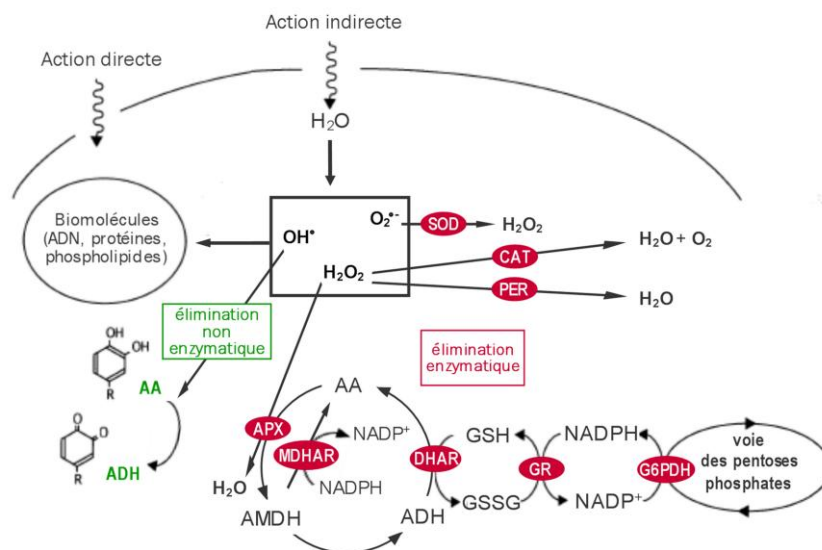
Des altérations au niveau des chloroplastes, des mitochondries et du réticulum endoplasmique ont été mises en évidence chez *A. thaliana* par microscopie électronique après une irradiation de 50 Gy (Wi *et al.* 2007). Elles sont principalement le résultat de la peroxydation lipidique au niveau des membranes (Vanhoudt *et al.* 2010) qui conduit à une perturbation des structures subcellulaires, notamment des organites qui sont le siège du métabolisme énergétique de la plante (respiration, photosynthèse).

Ainsi, l'observation des plantes irradiées révèle majoritairement des effets négatifs voire destructeurs des radiations ionisantes. Cependant, des signes de stimulation de la croissance ont parfois été mis en évidence suite à des doses faibles, comme sur *C. annuum* chez qui des augmentations de la taille des plantes, du nombre de feuilles et du poids sec des fruits ont été montrées après des expositions de 1 Gy, 2 Gy et 5 Gy (Kwon *et al.* 2001 ; Kim *et al.* 2005a).

### 2.3.3. Réponses au stress oxydant

Le stress oxydant causé par les RI a été mis en évidence dans les tissus végétaux par différentes méthodes de dosage ou de visualisation des ROS qu'il génère (Voisine *et al.* 1993 ; Wada *et al.* 1998 ; Wi *et al.* 2007 ; Lee *et al.* 2009 ; Vanhoudt *et al.* 2010). Suite à l'irradiation, les plantes activent des mécanismes de détoxification ayant pour but d'éliminer ces espèces radicalaires (Figure 2 ; pour une revue, voir Esnault *et al.* 2010). L'induction des enzymes de détoxification est largement documentée. L'activité de l'ascorbate peroxydase (APX), qui appartient au cycle glutathion-ascorbate (ou cycle Asada-Halliwell), augmente de façon dose dépendante dans des plantules de *C. annuum* sept jours après des expositions de 2 à 16 Gy (Kim *et al.* 2005a). Par ailleurs, des augmentations des activités superoxyde

dismutase (SOD) et peroxydase totale (PER) ont été rapportées chez des plantules de *C. annuum* après des doses de 10 et 50 Gy (Kwon *et al.* 2001), ainsi que chez des plantules de *Nicotiana debneyi* (tabac) exposées à 500 Gy (Wada *et al.* 1998). Pour cette dose, l'activité catalase (CAT) est augmentée dans l'espèce *N. tabacum* (Wada *et al.* 1998). Enfin, les activités SOD, PER, CAT et G<sub>6</sub>PDH (glucose 6-P déshydrogénase) sont fortement stimulées chez des plants de *Stipa capillata* (Poaceae) provenant de régions radioactivement contaminées suite à une nouvelle irradiation chronique expérimentale (Zaka *et al.* 2002a). L'activation de ces enzymes a également été rapportée après étude du transcriptome : chez *N. tabacum*, des gènes de glutathion-S-transférase, Cu/Zn-SOD, PER et CAT sont sur-exprimés après des doses de 30 et 50 Gy (Cho *et al.* 2000). Chez *A. thaliana*, les Cu/Zn-SOD cytosoliques et chloroplastiques ainsi que la DHAR (déhydroascorbate réductase) sont sur-exprimés après une irradiation de 200 Gy (Kim *et al.* 2007), tandis que les gènes des PER et APX sont activés chez *Oryza sativa* (riz) en réponse à de très faibles irradiations chroniques (4,5 µGy reçus en trois jours ; Rakwal *et al.* 2009). Il semble ainsi que l'APX n'intervienne que dans la réponse aux irradiations faibles ou chroniques, alors qu'elle est plutôt réprimée dans le cas des fortes doses.



**Figure 2 – Voies possibles de l'élimination des espèces radicalaires produites suite à l'exposition de la cellule aux radiations ionisantes par les activités antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques, d'après Vanacker *et al.* (1998) et Wada *et al.* (1998). AA : acide ascorbique ; ADH : acide déshydroascorbique ; AMDH : acide monodéshydroascorbique ; SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase ; PER : peroxydase ; GR : glutathion réductase ; G6PDH : glucose 6-P déshydrogénase ; APX : ascorbate peroxydase ; DHAR : déshydroascorbate réductase ; MDHAR : monodéshydroascorbate réductase.**

En addition des réponses enzymatiques, la production de composés antioxydants non enzymatiques peut également être observée après exposition aux RI, tels que les anthocyanes, les caroténoïdes ou la vitamine C (Fan et Thayer 2001 ; Kim *et al.* 2005a ; Nagata *et al.* 2005 ; Dixit *et al.* 2010).

#### 2.3.4. Régulations du métabolisme

La diminution de la croissance des plantes après exposition aux RI suggère fortement un ralentissement du métabolisme de la plante. Une étude récente sur *A. thaliana* soumis à des doses de 0,5 Gy à 150 Gy montre cependant que celle-ci n'est pas associée à des baisses de rendement des échanges gazeux relatifs à la photosynthèse et à la respiration, pas plus qu'à une modification de la fluorescence de la chlorophylle (Kurimoto *et al.* 2010). Par ailleurs, les études transcriptomiques réalisées sur les RI (Culligan *et al.* 2006 ; Kim *et al.* 2007 ; Kovalchuck *et al.* 2007) ne pointent pas particulièrement le métabolisme énergétique ni carboné. Ceux-ci peuvent toutefois être perturbés par le stress oxydant qui agit sur les structures cellulaires et qui provoque des pertes d'activités enzymatiques par dénaturation des protéines et des dégradations de métabolites essentiels tels que les pigments (Kim *et al.* 2005a). De plus, la plante peut réguler activement son métabolisme primaire afin de réorienter son énergie soit vers des voies secondaires impliquées dans la réponse au stress oxydant

nécessaire à sa survie, soit vers des voies liées à des phénomènes de mort cellulaire (apoptose) selon l'intensité du stress (Taylor *et al.* 2009).

Par ailleurs, d'anciens travaux ont mis en évidence des effets des RI sur les teneurs des plantes en hormones de croissance végétales qui pourraient en partie expliquer les effets observés sur la croissance. Ainsi, la production d'éthylène est induite immédiatement après irradiation chez les Citrus (de 250 Gy à 4 kGy, Riov *et al.* 1970), chez l'avocat (400 Gy, Kamali *et al.* 1972) et chez la tomate (1 kGy, Larrigaudière *et al.* 1991). Dans ce dernier travail, l'augmentation de la teneur en éthylène est liée à une induction traductionnelle du gène de l'ACC synthase, enzyme impliquée dans sa biosynthèse. L'irradiation provoque par contre une réduction de la teneur en auxine des coléoptiles de maïs (1 kGy, Momiyama *et al.* 1999) et des feuilles de Coleus (Gordon *et al.* 1971). D'autre part, une dose de RI de 200 Gy diminue la réponse d'élongation cellulaire à l'acide indolyl-3-acétique (AIA) des cellules de coléoptiles d'avoine (Miura *et al.* 1974). Chez le pommier, cette même dose réduit la translocation de l'AIA vers les cellules du tissu de l'écorce, ce qui se traduit par une diminution du gradient de polarité de l'AIA dans ce tissu par rapport au contrôle non irradié (Antoszewski *et al.* 1978). Enfin, l'irradiation réduit la biosynthèse des gibberellines chez le blé en germination, notamment en affectant l'activité de deux enzymes clés initiant la biosynthèse de l'acide gibberellique conversion des précurseurs (i.e. mévalonate kinase et adénosine triphosphatase) et en réduisant l'interconversion des différentes gibberellines (Machaiah *et al.* 1976).

Au niveau du transcriptome, la régulation de gènes liés à la réponse hormonale, notamment éthylène et auxine, a été mise en évidence chez *A. thaliana* après exposition aiguë ou chronique à une dose de 1 Gy (Kovalchuk *et al.* 2007).

Certaines activations du métabolisme secondaire ont également été rapportées dans des voies particulières après une exposition aux RI, comme la production de phytoalexines (Rakwal *et al.* 2009), la stimulation de la voie shikonine (Chung *et al.* 2006), l'accumulation d'allyl-isothiocyanate (Hung et Johnson 2008), de putrescine (Triantaphylidès *et al.* 1993) ou d'isoflavone (Dixit *et al.* 2010).

#### 2.3.5. Mécanismes de réparation de l'ADN

Toutes les macromolécules peuvent être affectées par les RI. Toutefois, l'ADN est une cible essentielle touchée à la fois par les effets directs et les effets indirects. Les effets des RI sur l'ADN aboutissent à de nombreuses altérations génétiques aléatoires allant de la délétion de base ponctuelle jusqu'aux aberrations chromosomiques potentiellement transmissibles aux

générations suivantes (cf Introduction générale – 2.2., et les deux revues De Micco *et al.* 2010 et Tanaka *et al.* 2010). Ces dernières ont été mises en évidence par microscopie dans de nombreux travaux comme, par exemple, sur *Pisum sativum* dès 0,4 Gy ou dans les cultures céréalières et les forêts de pin après l'accident de Chernobyl (Kal'chenko et Fedotov 2001 ; Zaka *et al.* 2002b ; Geraskin *et al.* 2003 ; Zaka *et al.* 2004). L'activation de mécanismes de réparation de l'ADN a donc logiquement été mise en évidence à différents niveaux dans la réponse des végétaux. Chez *A. thaliana*, une augmentation de la fréquence des événements de recombinaison homologue a été observée pour des doses de RI allant de la centaine de  $\mu\text{Gy}$  à 1 Gy, cette augmentation étant encore plus accentuée dans le cas d'une exposition chronique (Kovalchuk *et al.* 2000 ; Kovalchuk *et al.* 2007). D'autre part, les études transcriptomiques sur plantes entières ou sur cultures cellulaires indiquent une stimulation immédiate de l'expression de gènes de réparation tels que ATRAD54 (Osakabe *et al.* 2006), ATRAD51 (Doutriaux *et al.* 1998 ; Culligan *et al.* 2006), ATPARP-1, ATPARP-2, BRCA-1 (Culligan *et al.* 2006), UVH1 (Preuss et Britt 2003), ATLIG4 et ATERCC1 (West *et al.* 2000 ; Hefner *et al.* 2006). Parallèlement, on note l'induction de gènes liés à la biosynthèse des nucléotides tels que les ribonucléoside-diphosphate réductases R1 et TSO2 ainsi que de la thymidine kinase (Culligan *et al.* 2006 ; Kim *et al.* 2007). Certains de ces gènes constituent des points de contrôle qui peuvent induire en aval un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre les réparations de l'ADN, notamment *via* l'activation de kinases telles que ATM, qui contrôle les réparations des cassures double brin (DSBs), et WEE1, qui induit un arrêt du cycle en phase G2 (Culligan *et al.* 2006, De Schutter *et al.* 2007 ; Cools et De Veyler 2009). ATGR1 (Deveaux *et al.* 2000), CYCB1 ;1 (Culligan *et al.* 2006) et SOG1 (Preuss et Britt 2003) sont également des acteurs du cycle cellulaire dont la régulation est souvent observée après l'exposition aux RI.

### 3. Les glucosinolates

#### 3.1. Distribution phylogénétique des glucosinolates dans le règne végétal

Découverts au début du 17<sup>ème</sup> siècle pour être à l'origine du goût prononcé des graines de moutarde, les glucosinolates (GLSs) regroupent plus de 120 molécules issues du métabolisme secondaire des plantes de l'ordre des Brassicales (Figure 3). Parmi les familles appartenant à cet ordre, celle des Brassicaceae présente un intérêt agronomique et économique important, car elle regroupe de nombreuses espèces alimentaires pour l'homme ou le bétail dont *Brassica oleracea* (choux divers dont chou-fleur et brocoli), *Raphanus sativum* (radis), *Brassica rapa* (navet) ou *Brassica napus* (colza). Elle comprend également *A. thaliana*, la



première plante au génome entièrement séquencé, qui est l'un des modèles les plus fréquemment utilisés dans les laboratoires de recherche végétale.

On retrouve également des GLSs dans un petit nombre de plantes du genre *Drypetes* (famille des Euphorbiaceae). Une étude phylogénétique de ce genre basée sur le génome nucléaire et plastidien a confirmé qu'il s'agissait là d'une convergence et que les GLSs ont été « inventés deux fois » (Rodman *et al.* 1998).

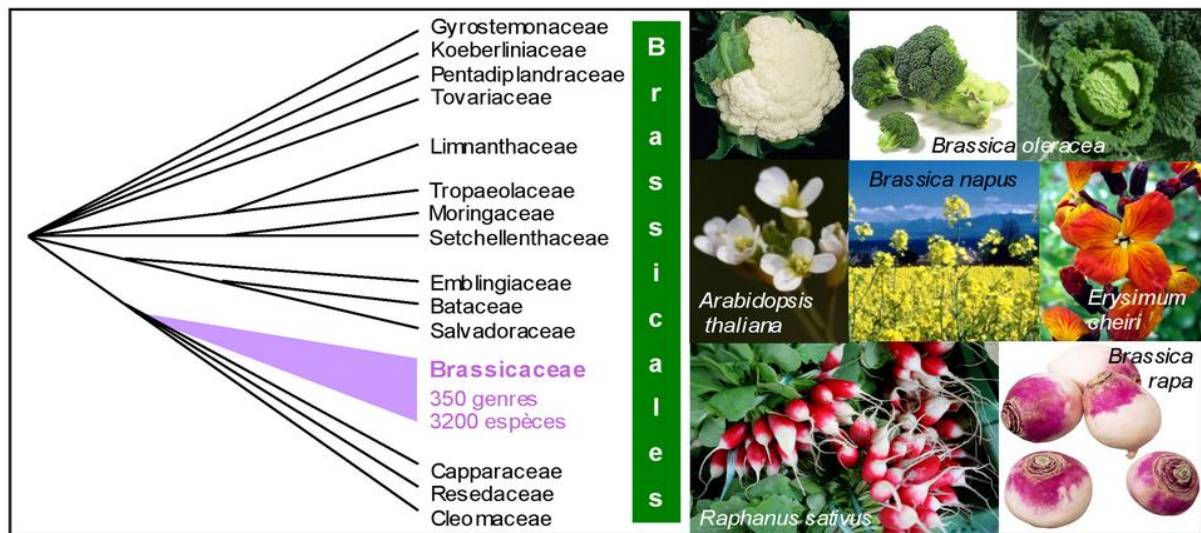


Figure 3 – Phylogénie de l'ordre des Brassicales et illustrations d'espèces d'intérêt économique de la famille des Brassicaceae d'après Ronse de Craene et Haston (2006).

### 3.2. Structure chimique et voies de biosynthèse

Les glucosinolates sont des thioglucosides (S-β-D-glucopyranosyl Z-thiohydroximoyl-O-sulfate esters) issus du métabolisme des acides aminés. Selon l'acide aminé de départ, ils sont classés en GLSs aliphatiques (alanine, méthionine, valine, leucine ou isoleucine), aromatiques (phénylalanine ou tyrosine) ou indoliques (tryptophane) (Figure 4). Leur chaîne latérale est agrémentée par une large variété de fonctions chimiques secondaires : les GLSs aliphatiques, majoritaires, présentent une chaîne carbonée simple ou branchée avec ou sans double liaison, des groupements carbonyles, hydroxyles, ou une liaison soufrée. Environ un tiers des GLSs contiennent dans leur chaîne latérale un atome de soufre qui peut être à différents stades d'oxydation : méthylthioalkyl, méthylsulfinylalkyl ou méthylsulfonylalkyl. Les GLSs des Brassicaceae, aliphatiques, ω-méthylthioalkyl, aromatiques ou hétérocycliques, sont les plus étudiés. Certains peuvent être utilisés comme chimio-marqueur phylogénétique : la glucocochléarine (1-méthylpropyl-GLS) et la glucoputranjvine (1-méthyléthyl-GLS) sont présentes seulement chez les plantes du genre *Cochlearia* (Brassicaceae) (Dauvergne *et al.* 2006). Le méthyl-GLS absent chez les Brassicaceae est spécifique de la famille des

Capparaceae. Un petit groupe de GLSs benzoïque possédant un sucre supplémentaire, rhamnose ou arabinose, lié au cycle aromatique par une liaison glucosidique, sont spécifiques des Moringaceae (13 arbres du genre *Moringa*) et des Resedaceae.

La plupart des espèces contiennent un nombre limité de GLSs, en général moins d'une douzaine, mais on a identifié 24 GLSs différents chez l'écotype Colombia-0 (Col-0) d'*A. thaliana* (Fahey *et al.* 2001 ; Petersen *et al.* 2001).

La biosynthèse des glucosinolates comporte trois étapes principales (Figure 4) :

**(a)** l'élongation de la chaîne latérale de l'acide aminé, conduisant par exemple à l'homométhionine, la dihomométhionine et la trihomométhionine qui sont précurseurs de nombreux GLSs aliphatiques.

**(b)** la formation de la structure caractéristique glycone du GLS, un aldoxime sulfaté constitué d'un résidu  $\beta$ -thioglycosyl attaché au carbone  $\alpha$  de l'acide aminé. Cette conversion de l'acide aminé en aldoxime fait intervenir plusieurs enzymes à cytochrome P450 (CYP) de la famille CYP79 reconnaissant la nature de l'acide aminé précurseur de son substrat et permettant la régulation de la biosynthèse des GLSs aliphatiques et des GLSs indoliques.

**(c)** des modifications secondaires diverses de la chaîne latérale, conduisant à une grande diversité de composés.

Malgré la publication de méthodes de synthèses chimique pour un certain nombre de GLSs, ces composés ne sont pas produits artificiellement en routine du fait de la complexité de l'enchaînement des réactions (Fahey *et al.* 2001). La production de standards de GLSs utilise donc généralement des méthodes d'extraction et de purification en partant d'espèces à fortes teneurs dans un GLS particulier. D'autre part, étant donné l'intérêt croissant pour les GLSs d'un point de vue médical (*cf* Introduction générale – 3.6. à suivre), la recherche concernant les gènes impliqués dans leur biosynthèse (plus de 20 découverts entre 2007 et 2010) s'intensifie en vue de leur production dans des systèmes génétiquement modifiés (Mikkelsen *et al.* 2010 ; Sonderby *et al.* 2010a). Les gènes connus à l'heure actuelle chez *A. thaliana* pour être impliqués dans la biosynthèse des GLSs et sa régulation sont présentés dans le Tableau 1. Les approches par génétique inverse relativement nombreuses sur cette voie métabolique ont permis d'isoler et de caractériser plusieurs mutants déplétés dans une ou plusieurs enzymes clés de cette biosynthèse qui sont disponibles dans les banques de ressources végétales.

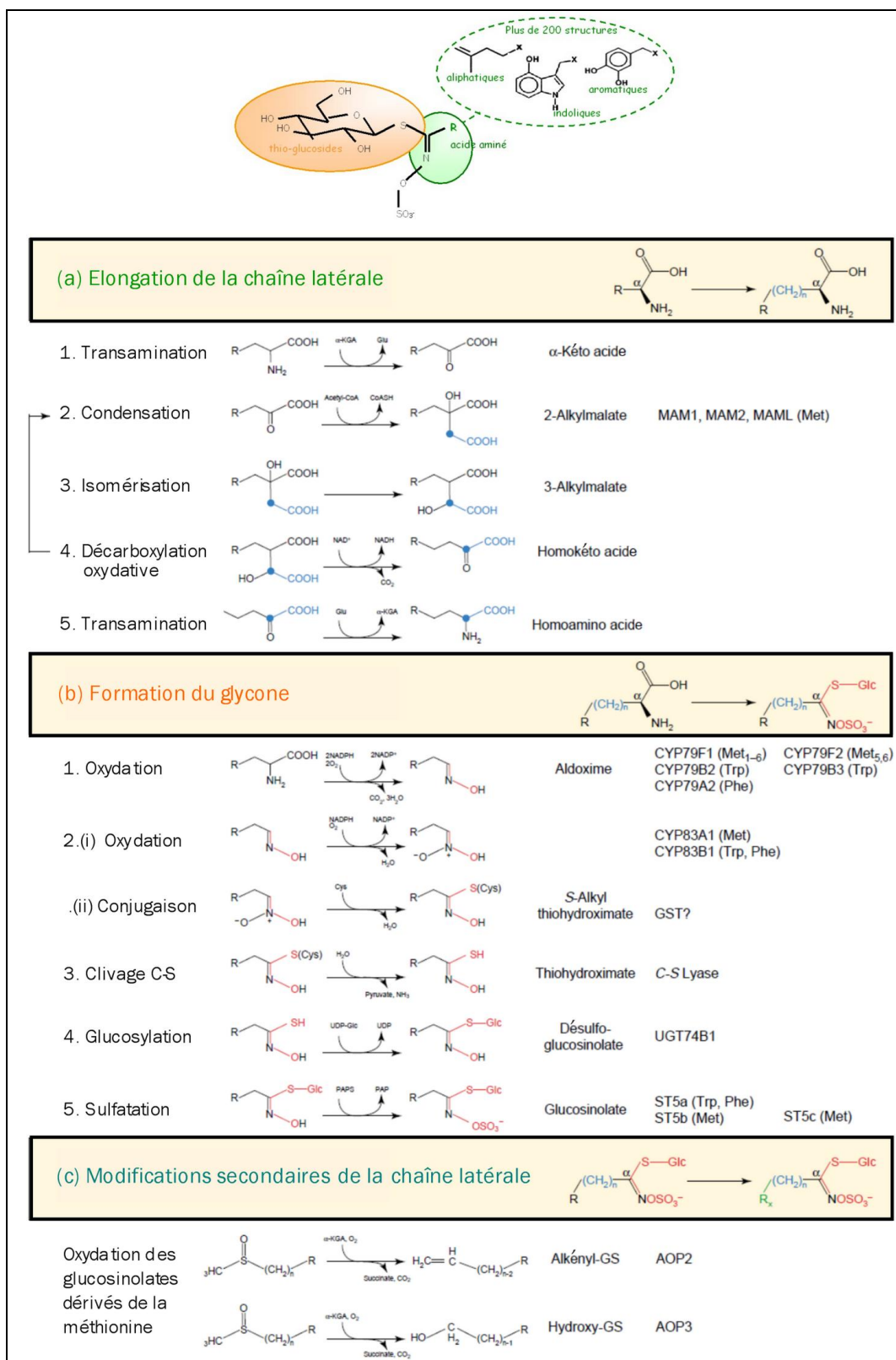


Figure 4 – Structure chimique et étapes de la voie de biosynthèse des glucosinolates, d'après Grubb et Abel, 2006.

**Tableau 1 – Gènes impliqués dans la biosynthèse des glucosinolates chez *A. thaliana*. GLSs = glucosinolates ; Type de glucosinolate : Al = glucosinolates aliphatiques (cc = chaîne courte ; cl = chaîne longue) ; Ar = glucosinolates aromatique ; Ind = glucosinolates indoliques ; FT = facteur de transcription ; Cpt = compartiment cellulaire ; Cyto = cytosol ; Clp = chloroplaste ; RE = réticulum endoplasmique ; ↑ : induction transcriptionnelle.**

Produit	Etape	Locus	Type	Cpt	Référence
<b>Elongation de la chaîne acide aminée</b>					
BCAT4	Désamination initiale	At3g19710	Al	Cyto	Schuster et al. 2006, <i>Plant Cell</i> 18: 2664-79
BCAT3	Fin d'élongation de la chaîne	At3g49680	Al	Clp	Knill et al. 2008, <i>Plant Physiol</i> 146: 1028-39
MAM1	Condensation	At5g23010	Al	Clp	Textor et al. 2004, <i>Planta</i> 218: 1026-35
MAM2	Condensation absent chez Col-0	-	Al	Clp	Kroymann et al. 2003, <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> . 100 Suppl 2: 14587-92
IMS2 / MAM3	Condensation	At5g23020	Al	Clp	Textor et al. 2007, <i>Plant Physiol</i> 144: 60-71
<b>Formation du glycone</b>					
CYP79A2	1 <sup>ère</sup> oxydation	At5g05260	Al		Wittstock et al. 2000, <i>J Biol Chem</i> 275: 14659-66
CYP79B2	1 <sup>ère</sup> oxydation	At4g39950	Ind	Clp	Mikkelsen et al. 2000, <i>J Biol Chem</i> 275: 33712-17
CYP79B3	1 <sup>ère</sup> oxydation	At2g22330	Ind	Clp	Hull et al. 2000, <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 97:2379-84
CYP79F1	1 <sup>ère</sup> oxydation	At1g16410	Al cc	RE	Chen et al. 2003, <i>Plant J</i> 33: 923-937
CYP79F2	1 <sup>ère</sup> oxydation	At1g16400	Al cl	RE	Chen et al. 2003, <i>Plant J</i> 33: 923-937
CYP83A1	2 <sup>ème</sup> oxydation	At4g13770	Al	RE	Naur et al. 2003, <i>Plant Physiol</i> 133:63-72
CYP83B1	2 <sup>ème</sup> oxydation	At4g31500	Ar, Ind		Naur et al. 2003, <i>Plant Physiol</i> 133:63-72
CS-lyase	Clivage C-S	At2g20610	Al, Ind	Cyto	Mikkelsen et al. 2004, <i>Plant J</i> 37: 770-777
UGT74B1	Glucosylation	At1g24100	Al, Ind	Cyto	Grubb et al. 2004, <i>Plant J</i> 40: 893-908
ST5a / SOT16	Sulfatation	At1g74100	Ind, Ar	Cyto	Piotrowskiet al. 2004, <i>J Biol Chem</i> 279: 50717-25
ST5b / SOT18	Sulfatation	At1g74090	Al	Cyto	Piotrowskiet al. 2004, <i>J Biol Chem</i> 279: 50717-25
ST5c / SOT17	Sulfatation	At1g18590	Al	Cyto	Piotrowskiet al. 2004, <i>J Biol Chem</i> 279: 50717-25
<b>Modification de la chaîne carbonée</b>					
FMO GS-OX1	S-oxygénation	At1g65860	Al	Cyto	Li et al. 2008, <i>Plant Physiol</i> 148: 1721-33
FMO GS-OX2	S-oxygénation	At1g62540	Al	Cyto	Li et al. 2008, <i>Plant Physiol</i> 148: 1721-33
FMO GS-OX3	S-oxygénation	At1g62560	Al	Cyto	Li et al. 2008, <i>Plant Physiol</i> 148: 1721-33
FMO GS-OX4	S-oxygénation	At1g62570	Al	Cyto	Li et al. 2008, <i>Plant Physiol</i> 148: 1721-33
FMO GS-OX5	S-oxygénation	At1g12140	Al	Cyto	Li et al. 2008, <i>Plant Physiol</i> 148: 1721-33
AOP1		At4g03070			
AOP2	Alkenyl-GLSs	?			Kliebenstein et al.2001a, <i>Plant Physiol</i> 126:811-825
AOP3	Hydroalkyl-GLSs	At4g03050			Kliebenstein et al.2001a, <i>Plant Physiol</i> 126:811-825
CYP81F1	I3M → 1 ou 4 OH-I3M	At4g37430	Ind		Pfalz et al. 2011, <i>Plant Cell</i> 23: 716-729
CYP81F2	I3M → 4OH-I3M	At5g57220	Ind		Pfalz et al. 2009, <i>Plant Cell</i> 21: 985-999
CYP81F3	I3M → 1 ou 4 OH-I3M	At4g37400	Ind		Pfalz et al. 2011, <i>Plant Cell</i> 23: 716-729
CYP81F4	I3M → 1 ou 4 OH-I3M	At4g37410	Ind		Pfalz et al. 2011, <i>Plant Cell</i> 23: 716-729
IGMT1	(4/1)OH-I3M → (4/1)MO-I3M	At1g21100	Ind		Pfalz et al. 2011, <i>Plant Cell</i> 23: 716-729
IGMT2	(4/1)OH-I3M → (4/1)MO-I3M	At1g21120	Ind		Pfalz et al. 2011, <i>Plant Cell</i> 23: 716-729
<b>Regulation</b>					
Myb28 / HAG1	FT, ↑ biosynthèse des Al	At5g61420	Al		Hirai et al 2007, <i>PNAS</i> 104: 6478-83
Myb29	FT, ↑ MeJA Al-dépendante	At5g07690	Al		Hirai et al 2007, <i>PNAS</i> 104: 6478-83
Myb76 / HAG2	FT, régulation du transport et de la distribution des GLSs	At5g07700	Al		Sønderby et al. 2010b, <i>Plant Physiol</i> 153: 348-363
Myb51 / HIG1	FT, ↑ biosynthèse des Ind	At1g18570	Ind		Gigolashvili et al.2007, <i>Plant J</i> 50: 886-901
Myb34 / ATR1	FT, homéostasie AIA / Ind	At5g60890	Ind		Celenza et al. 2005, <i>Plant Physiol</i> 137: 253-262
IQDI	FT, régulateur	At3g09710	Ind, Al		Levy et al. 2005, <i>Plant J</i> 43: 79-96
OBP2	FT, ↑ biosynthèse des Ind	At1g07640	Ind		Skiryecz et al. 2006, <i>Plant J</i> 47: 10-24
ATMKK9	MAP kinase kinase	At1g73500			Xu et al. 2008, <i>J Biol Chem</i> 283: 26996-27006
BAT5	Transport chloroplastique (cible Myb28 )	At4g12030	Al		Gigolashvili et al.2009, <i>Plant Cell</i> 21: 1813-29

### 3.3. Catabolisme des glucosinolates

Les GLSs sont dégradés par des  $\beta$ -glucosidases spécifiques, les thioglucoside glucohydrolases (TGGs, EC 3.2.1.147) communément appelées myrosinases. Celles-ci ont été détectées chez toutes les plantes étudiées contenant des GLSs. Ce sont des protéines homodimériques comprenant deux sous-unités de masse moléculaire 59 kDa dont la chaîne protéique est glycosylée (principalement fucose, mannose et N-acétylglucosamine) (Rask *et al.* 2000). L'affinité des myrosinases est spécifique du groupement D-glucopyranosyl mais elle montre par contre une grande flexibilité par rapport au groupement aglycone, à la chaîne latérale ou au groupe aliphatique, indolique ou aromatique du GLS (Sørensen 1990 ; James et Rossiter 1991). En principe, tous les GLSs sont acceptés comme substrats de la myrosinase avec de faibles différences. La structure tridimensionnelle confirmant ce point de vue, révèle une poche hydrophobe large pouvant interagir avec une large gamme de substrats (Burmeister *et al.* 1997). L'hydrolyse enzymatique d'un GLS libère un glucose, un sulfate, et un aglycone qui se réarrange spontanément en isothiocyanate ou est converti en dérivé nitrile, épithionitrile, thiocyanate ou oxazolidine. Certains facteurs comme le pH, la présence d'ions métalliques, peuvent orienter la réaction vers l'un ou l'autre de ces produits. Par exemple, la formation de nitriles nécessite la présence de  $Fe^{2+}$  (Bones et Rossiter 2006). D'autre part, les myrosinases peuvent former des complexes avec des protéines dites « spécifiques » qui orientent également l'hydrolyse des GLSs. Chez les Brassicaceae, ces cofacteurs comprennent des protéines épithio-spécifiques (ESP pour « epithiospecifier protein »), des protéines nitrile-spécifiques (NSPs pour « nitrile specifier protein »), et des protéines thiocyanate-formatrices (TFPs pour « thiocyanate-forming proteins »), ces dernières n'étant pas détectées chez *A. thaliana* à l'heure actuelle (Figure 5 ; Wittstock et Burow 2010).

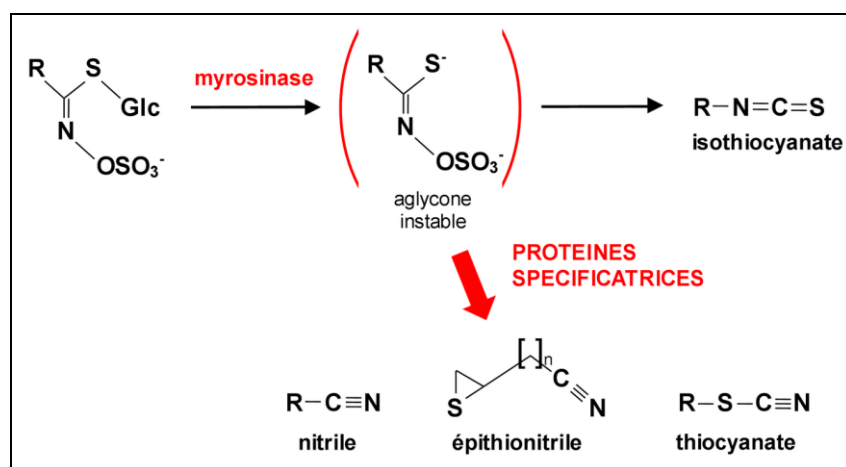


Figure 5 – Hydrolyse enzymatique des glucosinolates, d'après Burow *et al.* 2009. Glc : glucose.

Chez la plupart des Brassicaceae, les myrosinases sont codées par une famille de gènes divisée en 3 sous-familles déterminées par homologie des séquences d'ADNc, notées MA (ou Myr1), MB (ou Myr2) et MC et présentant des profils d'expression spatio-temporels différents. Leur présence dépend des espèces mais il n'y a pas de corrélation entre la diversité en GLSs et la diversité des myrosinases. *B. napus* possède la plus large famille de myrosinases connue (environ 20 : 5 MA, 10-15 MB et 5 MC). *A. thaliana* possède 4 myrosinases fonctionnelles (6 gènes, TGG1-6, dont 2 pseudogènes ; cf Tableau 2) mais des études phylogénétiques ont montré qu'elles n'appartiennent pas aux mêmes groupes d'isoenzymes et qu'elles sont apparues après divergence de l'espèce avec les autres Brassicaceae (Xue *et al.* 1995). Les myrosinases sont accumulées dans des idioblastes spécifiques appelés les « myrosin cells ». Ces cellules sont éparpillées dans les différents organes de la plante et contiennent également des ARNm codant pour l'enzyme, ce qui suggère fortement qu'elles sont également le siège de la synthèse des myrosinases (Rask *et al.* 2000, Wittstock et Burow 2010). Les myrosinases peuvent également être exprimées dans d'autres types cellulaires tels que les cellules de garde (Rask *et al.* 2000).

En plus des myrosinases classiques, certaines  $\beta$ -glucosidases présentant une structure atypique auraient également une activité myrosinase chez *A. thaliana*. C'est le cas de PEN2 et PYK10, appartenant toutes deux à un sous-groupe de  $\beta$ -glucosidases dont les profils d'expression montrent une implication dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. PEN2, localisée dans les peroxisomes, est capable d'hydrolyser les GLSs avec une préférence pour les indoles et participe à un mécanisme de défense contre les maladies cryptogamiques impliquant la sécrétion de vésicules (Underwood et Somerville 2008 ; Bednarek *et al.* 2009 ; Clay *et al.* 2009). PYK10 est spécifique des racines. Elle peut former un complexe plus ou moins important avec deux types de protéines, les JALs (*angl.* « *jacalin-related lectins* ») et les GLLs (*angl.* « *GDSL lipase-like proteins* ») qui jouent un rôle dans la polymérisation de ce complexe (activateur ou inhibiteur) et dans l'orientation de l'hydrolyse vers tel ou tel produit, comme les protéines spécifiques des myrosinases classiques. PYK10 est détectée en abondance dans les « corps RE » (« ER bodies »), petites structures ellipsoïdales indépendantes dérivées du réticulum endoplasmique qui s'accumulent dans les cellules épidermiques des plantules et dont la formation peut aussi être induite au niveau de blessures (Yamada *et al.* 2009). Les cofacteurs JALs et GLLs seraient eux plutôt localisés dans le cytosol, le cytosquelette ou la matrice extracellulaire (étude bioinformatique *via* les outils WoLF PSORT et TargetP). Cette compartimentation soutiendrait l'hypothèse d'un mécanisme d'hydrolyse des GLSs qui se déclencherait au moment de la disruption des tissus

comme pour les myrosinases classiques (Nagano *et al.* 2008) (*cf* Introduction générale – 3.4.1.).

Il existe également des myrosinases fongiques et bactériennes. Elles sont notamment présentes chez beaucoup de bactéries commensales de l'intestin humain ou animal (rat, poule) et sont responsables de la conversion des GLSs en isothiocyanate lors de leur ingestion. Les pucerons cruciférivores *Brevicoryne brassicae* et *Lipaphis erysimi* possèdent également leur propre myrosinase (Fahey *et al.* 2001).

**Tableau 2 – Gènes impliqués dans l'hydrolyse enzymatique des glucosinolates chez *A. thaliana*.** FT = facteur de transcription ; MyAP = « myrosinase-associated protein » ; Cpt = compartiment cellulaire ; Cyto = cytosol ; Clp = chloroplaste ; RE = réticulum endoplasmique ; cRE = corps RE ; Extr. = matrice extracellulaire ; Cysq. = cytosquelette.

Produit	Étape	Locus	Cpt	Référence
TGG1 / BGLU38	$\beta$ -thioglucohydrolase	At5g26000		Wittstock et Burow 2010, <i>Arabidopsis Book</i> 8 e0134
TGG2 / BGLU37	$\beta$ -thioglucohydrolase	At5g25980		Wittstock et Burow 2010, <i>Arabidopsis Book</i> 8 e0134
TGG3 / BGLU39	$\beta$ -thioglucohydrolase pseudogène chez Col-0	At5g48375		Wittstock et Burow 2010, <i>Arabidopsis Book</i> 8 e0134
TGG4 / BGLU34	$\beta$ -thioglucohydrolase	At1g47600		Wittstock et Burow 2010, <i>Arabidopsis Book</i> 8 e0134
TGG5 / BGLU35	$\beta$ -thioglucohydrolase	At1g51470		Wittstock et Burow 2010, <i>Arabidopsis Book</i> 8 e0134
TGG6 / BGLU36	$\beta$ -thioglucohydrolase pseudogène chez Col-0	At1g51490		Wittstock et Burow 2010, <i>Arabidopsis Book</i> 8 e0134
PEN2 / BGLU26	$\beta$ -glucosidase	At2g44490		Bednarek <i>et al.</i> 2009, <i>Science</i> 323(5910):101-106
PYK10 / BGLU23	$\beta$ -glucosidase	At3g09260	RE	Nagano <i>et al.</i> 2008, <i>Plant Cell Physiol</i> 49: 969–980
BGLU21	$\beta$ -glucosidase – complexe PYK10	At1g66270		Nagano <i>et al.</i> 2008, <i>Plant Cell Physiol</i> 49: 969–980
BGLU22	$\beta$ -glucosidase – complexe PYK10	At1g66280		Nagano <i>et al.</i> 2008, <i>Plant Cell Physiol</i> 49: 969–980
MBP1 / JAL7	myrosinase binding protein	At1g52040	Cysq	Takechi <i>et al.</i> 1999, <i>Plant Cell Physiol</i> 40:1287-1296
MVP1	MyAP, nitrile formation	At1g54030	cRE	Agee <i>et al.</i> 2010, <i>Plant Physiol</i> 152: 120-132
ESP / ESR	epithiospecififier protein	At1g54040		Lambrix <i>et al.</i> 2001, <i>Plant Cell</i> 13: 2793–2807
ESM1 / GLL65	epithiospecififier modifieur	At3g14210		Zhang <i>et al.</i> 2006, <i>Plant Cell</i> 18: 1524–1536
NSP1 / JAL28	nitrile-specififier protein	At3g16400	Cysq/Cyto	Burow <i>et al.</i> 2009, <i>Plant Physiol</i> 149 : 561–574
NSP2 / JAL21	nitrile-specififier protein	At2g33070	Cyto	Kissen <i>et al.</i> 2009, <i>J Biol Chem</i> 284:12057–70
NSP3 / JAL27	nitrile-specififier protein	At3g16390	Cysq/Cyto	Burow <i>et al.</i> 2009, <i>Plant Physiol</i> 149 : 561–574
NSP4 / JAL29	nitrile-specififier protein	At3g16410	Cyto	Burow <i>et al.</i> 2009, <i>Plant Physiol</i> 149 : 561–574
NSP5	nitrile-specififier protein	At5g48180		Burow <i>et al.</i> 2009, <i>Plant Physiol</i> 149 : 561–574
SNARE VAM3	Agit sur les cellules contenant les myrosinases et sur TGG1-TGG2	At5g46860		Ueda <i>et al.</i> 2006, <i>Plant Cell Physiol</i> 47 :164-175
GLL22	MyAP	At1g54000	Extr	Nagano <i>et al.</i> 2008, <i>Plant Cell Physiol</i> 49: 969–980
GLL23	MyAP	At1g54010	Extr	Nagano <i>et al.</i> 2008, <i>Plant Cell Physiol</i> 49: 969–980
JAL22	inhibiteur du complexe PYK10	At2g39310	Cyto	Nagano <i>et al.</i> 2008, <i>Plant Cell Physiol</i> 49: 969–980
JAL30 / PBP1	inhibiteur du complexe PYK10	At3g16420	Cyto	Nagano <i>et al.</i> 2008, <i>Plant Cell Physiol</i> 49: 969–980
JAL23	PYK10 complex polymerizer	At2g39330	Cyto	Nagano <i>et al.</i> 2008, <i>Plant Cell Physiol</i> 49: 969–980
JAL31	PYK10 complex polymerizer	At3g16430	Cysq	Nagano <i>et al.</i> 2008, <i>Plant Cell Physiol</i> 49: 969–980
JAL35 / JR1	ESP-like jacalin-related lectin – PYK10 complex	At3g16470		Nagano <i>et al.</i> 2008, <i>Plant Cell Physiol</i> 49: 969–980
GLL25	GDSL lipase-like protein – complexe PYK10	At1g54030	cRE	Nagano <i>et al.</i> 2008, <i>Plant Cell Physiol</i> 49: 969–980
NAI1	FT, formation des cRE	At2g22770		Matsushima <i>et al.</i> 2004, <i>Plant Cell</i> 16: 1536–1549

### 3.4. Rôles des glucosinolates dans la plante

#### 3.4.1. Défense contre les ravageurs

Le principal rôle biologique connu aux GLSs est la défense de la plante contre les ravageurs par le biais de leurs dérivés. Leur mode d'action, qui implique l'intervention de la myrosinase, a été bien caractérisé sous le nom de « mustard oil bomb ». Les GLSs non toxiques sont accumulés dans les vacuoles des cellules dans toute la plante, les concentrations les plus élevées ayant été détectées au niveau des organes reproducteurs (graines, siliques, inflorescences). Au niveau de la fleur d'*A. thaliana*, il existe un type particulier de cellule dans lequel les GLSs sont accumulés de manière importante (>100 mM). Elles sont appelées « cellules-S », du fait de leur teneur importante en soufre, et sont situées entre les vaisseaux du phloème et l'endoderme (Koroleva *et al.* 2000 ; Grubb et Abel 2006). Lors du broutage par un ravageur, la destruction des tissus de la plante abolit la compartimentation GLSs (dans les cellules-S) / myrosinases (dans les « myrosin-cells ») et l'hydrolyse des GLSs libère soudainement une grande diversité de produits bioactifs (notamment ITCs, thiocyanates ou nitriles), toxiques ou répulsifs contre les insectes et les pathogènes. Parmi eux, les ITCs semblent être les molécules les plus toxiques envers les ennemis des plantes alors que la production alternative de composés moins toxiques, comme les nitriles induits par la protéine ESP, conduit à une augmentation de l'herbivorisme par les insectes généralistes. Ce phénomène pourrait cependant constituer un mécanisme indirect de défense contre les spécialistes des Brassicaceae en atténuant la reconnaissance de l'hôte. En effet, les ITC, molécules très volatiles, ont été identifiées comme stimulant de leur oviposition, tout comme les GLSs (Roessingh *et al.* 1994 ; Lambrix *et al.* 2001 ; Renwick *et al.* 2006 ; De Vos *et al.* 2008). D'autre part, les nitriles peuvent avoir un pouvoir attractif vis à vis de certains parasitoïdes utiles comme *Cotesia rubecula* (hyménoptère), parasitoïde de *Pieris rapae* (Lépidoptère spécialiste), comme cela a été démontré par sur-expression de la protéine ESP chez *A. thaliana* (Mumm *et al.* 2008). La coévolution a abouti à des adaptations des spécialistes à la « bombe moutarde » par différentes stratégies. Les insectes suceurs, notamment les aphides, contournent la toxicité des ITCs par leur mode de nutrition. En effet, le prélèvement de la sève par piqûre dans le phloème ne perturbe nullement la compartimentation GLSs / myrosinase. *Brevicoryne brassicae* séquestre ainsi des GLSs intacts dans son hémolymphe et les utilise pour sa propre défense, possédant sa propre myrosinase stockée dans des structures cristallines de certains muscles et mimant parfaitement le système de défense des plantes contenant des GLSs. Les larves du genre



*Athalia* sont les seuls insectes « mâcheurs » chez lesquels des GLSs intacts ont été détectés. Ils sont également utilisés comme défense contre leurs prédateurs, mais le mécanisme d'inhibition de l'hydrolyse des GLSs chez ces espèces demeure inconnu (Müller et Wittstock 2005). Parmi les autres stratégies mises en lumière, citons la production d'une NSP orientant l'hydrolyse des GLSs vers les nitriles chez plusieurs espèces de piérides (Lépidoptères), la désulfatation rapide des GLSs étudiée chez *Plutella xylostella*, les désulfoGLSs n'étant plus des substrats de la myrosinase (Winde et Wittstock 2011) ou la combinaison des ITC à des glutathion synthétases chez un champignon comme *Alternaria brassicicola* (Calmes, 2011). L'efficacité des GLSs et de leurs dérivés a été démontrée contre certaines souches de bactéries (Brader *et al.* 2001, Brader *et al.* 2006) et de champignons cryptogamiques (Underwood et Somerville 2008, Hiruma *et al.* 2010), contre des nématodes (Lazzeri *et al.* 2004) et contre les insectes herbivores généralistes (Giamoustaris et Mithen 1995). Les propriétés de cette famille de composés en font de bons candidats pour une utilisation en lutte biologique contre les ennemis des cultures par biofumigation (Michel *et al.* 2007 ; Omirou *et al.* 2011).

#### 3.4.2. Rôle dans la nutrition

Certaines données suggèrent la participation des GLSs dans la nutrition soufrée en conditions de carence en soufre (Schnug 1990 ; Rask *et al.* 2000 ; Falk *et al.* 2007).

#### 3.4.3. Régulation de la croissance et connexions avec le métabolisme de l'auxine

Les GLSs indoliques participent également à la régulation de la croissance des plantes de l'ordre des Brassicales *via* le maintien de l'homéostasie de l'auxine (AIA). En effet, les acétaldoximes indoliques, formés lors de la première oxydation par les CYP79B2 et CYP79B3, sont précurseurs pour les deux voies de biosynthèse (Grubb et Abel 2006). L'homéostasie de l'auxine serait maintenue par un contrôle négatif indirect de la voie de biosynthèse des GLSs indoliques sur celle de l'auxine (Figure 6) : l'augmentation du niveau d'auxine activerait l'expression des gènes CYP83B1 et UGT74B1 ce qui orienterait le flux des indoles acétaldoximes vers la synthèse des GLSs indoliques plutôt que vers la synthèse d'auxine (Hull *et al.* 2000 ; Grubb *et al.* 2004). Cette hypothèse est soutenue d'autre part par l'activation du gène CYP83B1 par la lumière rouge (implication d'un photorécepteur de type phytochrome B). Ainsi, une forte luminosité orienterait également l'utilisation des acétaldoximes vers la biosynthèse des GLSs indoliques au dépend de la production d'AIA,

inhibant ainsi l'élongation cellulaire et le processus d'étiollement (allongement de l'hypocotyle).

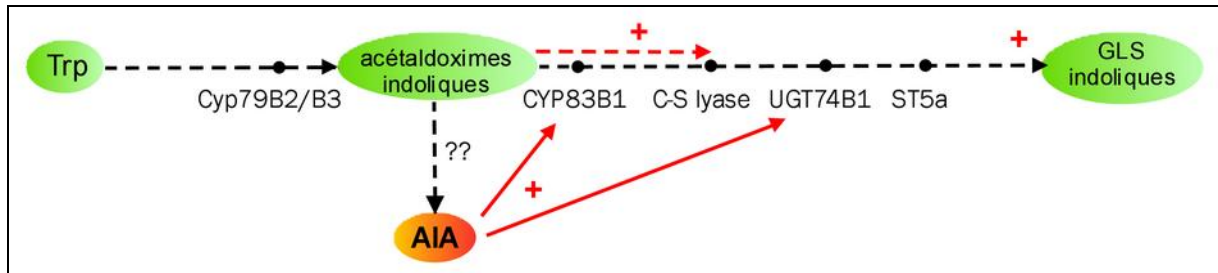


Figure 6 – Connexion métabolique et inter régulation entre la voie de biosynthèse des glucosinolates indoliques et la voie de biosynthèse de l'auxine, d'après Grubb et Abel, 2006. AIA : acide indolyl-3-acétique ; Trp : tryptophane.

Cette voie de biosynthèse de l'auxine particulière chez les Brassicaceae jouerait d'autre part un rôle important dans les processus de réparation, et pourrait expliquer notamment la radiorésistance importante de ces plantes. En effet, la formation de l'auxine *via* la biosynthèse de la glucobrassicine et d'un intermédiaire 3-indolylacetonitrile, est largement moins attaquée par les radiations que la voie de biosynthèse classique (Vackova et Kutacek, 1976).

### 3.5. Facteurs influant sur le métabolisme des glucosinolates

De nombreux résultats ont montré que la biosynthèse des GLSs pouvait être régulée par des facteurs environnementaux et que cette régulation impliquait certaines voies de signalisation hormonales.

#### 3.5.1. Facteurs abiotiques

La nutrition minérale, notamment la disponibilité en soufre et en azote (Kim *et al.* 2002 ; Hiraï *et al.* 2004 ; Falk *et al.* 2007 ; Favollo *et al.* 2011), la température, la lumière, la disponibilité en eau, la teneur en CO<sub>2</sub> atmosphérique (Clossais et Larher 1991 ; Schonhof *et al.* 2007), les blessures mécaniques (Mikkelsen *et al.* 2003), mais aussi la présence de métaux lourds peuvent influencer sur l'accumulation des GLSs totaux ou individuels (Noret *et al.* 2007 ; Yan et Chen 2007).

#### 3.5.2. Facteurs biotiques

Il y a accumulation active de GLSs dans le cas d'infection par des pathogènes non spécifiques comme dans le cas d'*Alternaria brassicae* ou *Erwinia carotovora* (Doughy *et al.* 1991 ; Brader *et al.* 2001). Les attaques des herbivores agissent de manière contrastée sur les teneurs en GLSs. Une baisse de celles-ci a été observée dans les feuilles de choux cultivés après invasion par des ravageurs de la famille des lépidoptères (Velasco et Cartea 2007). Au

contraire, chez le colza et la moutarde, l'altise des crucifères (*Phyllotreta vittula*) induit une augmentation des teneurs en GLSs indoliques dans les cotylédons, cette réponse pouvant par ailleurs être modifiée par la nutrition en soufre (Bodnaryk 1992). Une augmentation des teneurs en GLSs a également été démontrée chez *A. thaliana* en réponse à la consommation par des pucerons et des lépidoptères, généralistes et spécialistes des Brassicaceae. Cette accumulation est corrélée à une augmentation de la transcription de la plupart des gènes de la voie de biosynthèse des GLSs aliphatiques, et aboutit à une augmentation des teneurs en GLSs aliphatiques sauf dans le cas de l'invasion par *P. rapae* (lépidoptère spécialiste - pas de changement significatif). La même approche sur des mutants bloqués dans les voies de signalisation du jasmonate (JA), de l'acide salicylique (SA) ou de l'éthylène a montré que ces trois hormones étaient impliquées dans l'augmentation de la transcription des gènes de biosynthèse des GLSs en réponses aux ravageurs (Mewis *et al.* 2006).

### 3.5.3. Régulations hormonales

L'accumulation de GLSs en réponse à des applications d'hormones de croissance a été largement documentée. Chez le colza, le SA et le meJA induisent respectivement la production du 2-phenylethyl-GLS et la production des indoyle-GLS (Bodnaryk 1994 ; Kiddle *et al.* 1994). L'accumulation hormone-dépendante des GLSs a également été mise en évidence chez *A. thaliana*, par des traitements au meJA, au SA et à l'éthylène (Brader *et al.* 2001 ; Kliebenstein *et al.* 2002 ; Mikkelsen *et al.* 2003). Un modèle de régulation des gènes de biosynthèse des GLSs indoliques par interaction des ces 3 voies a été proposé (Mikkelsen *et al.* 2003). Plusieurs facteurs de transcription intervenant dans la chaîne signalétique ont été identifiés comme le facteur myb29 (Hiraï *et al.* 2007 ; pour une revue, voir Yan et Chen 2007).

Les hormones sont également impliquées dans le catabolisme des GLSs. C'est notamment le cas pour le MeJA qui régule l'hydrolyse des GLSs par la  $\beta$ -glucosidase PYK10 en induisant la formation des ER bodies (Nagano *et al.* 2005) et la production de certains partenaires du complexe enzymatique comme JAL35 / JR1 (*angl.* « *jasmonate responsive 1* »).

### 3.6. Effets chimiopréventifs et antioxydants des glucosinolates

Les plantes productrices de GLSs sont utilisées dans les médecines traditionnelles pour leurs propriétés pharmaceutiques diverses. Par exemple, les extraits de Moringaceae sont utilisés comme coagulant, désinfectant et antibiotique, cette dernière propriété ayant été

attribuée au 4( $\alpha$ -L-Rhamnosyloxy) benzyl isothiocyanate (Eilert *et al.* 1981 ; Fahey *et al.* 2001). Les germes de brocoli riches en sulforaphane réduisent la colonisation de l'estomac par *Helicobacter pylori* et atténuent la gastrite chez la souris et l'Homme infectés par la bactérie (Yanaka *et al.* 2009). Par ailleurs, la consommation de Brassicaceae confèrerait aux mammifères (dont les humains) un effet protecteur contre l'oxydation de l'ADN notamment après une irradiation  $\gamma$  (Verhagen *et al.* 1997 ; Deng *et al.* 1998 ; Zhu et Loft 2001 ; Wu *et al.* 2004 ; Tiku *et al.* 2008). Cela serait associé à une modulation de la peroxydation des lipides et à une augmentation de la teneur en glutathion (Tiku *et al.* 2008). D'une manière générale, les GLSs sont considérés comme contribuant fortement au bénéfice nutritionnel des *Brassicaceae*. De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales apportent des éléments démontrant que la consommation régulière de crucifères exerce un effet protecteur contre certains cancers, cet effet pouvant être en corrélation avec la teneur en GLSs de ces légumes (Verhoeven *et al.* 1996 ; IARC 2004 ; Moy *et al.* 2008). En parallèle, des études ciblées ont montré des effets inhibants de dérivés de GLSs utilisés sous forme de molécules pures, sur la croissance de cellules cancéreuses ou de tumeurs *in vivo*. C'est le cas de certains ITCs, comme le sulforaphane, dérivé de la glucoraphanine présente en grande quantité dans les brocolis (Zhang *et al.* 1992), l'érucine, dérivé de la glucoérucine présente dans la roquette (Fimognari *et al.* 2004), la raphasatine issue des germes de daïkon (radis chinois) (Papi *et al.* 2008) ou l'isothiocyanate de phénéthyle issu de la gluconasturtiine (dans le cresson) (Xiao *et al.* 2006). Les ITCs formés à partir des GLSs indoliques sont instables et se décomposent spontanément notamment en indole-3-carbinol et 3,3'-diindolelylméthane. Du fait de leur toxicité, ces deux métabolites présentent également un potentiel chimioprotecteur en empêchant la croissance des cellules cancéreuses. Ce potentiel est ainsi étudié dans le cadre de la lutte contre le cancer de la prostate (Zhang *et al.* 2003 ; Sarkar et Li 2004 ; Kim *et al.* 2005b ; Wang *et al.* 2012). De plus, il a récemment été mis en évidence pour la première fois un effet chimiopréventif des GLSs intacts que sont la glucoraphanine et la glucoérucine (Abdull Razis *et al.* 2011a ; 2011b).

Plusieurs processus peuvent être impliqués, parfois de manière simultanée, dans la prévention et la réduction des cancers :

**(a)** L'inhibition métabolique de la carcinogenèse par apoptose des cellules initiatrices de tumeurs humaines. D'une part, des perturbations de la division cellulaire ont été observées aboutissant à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (observation sur des cellules de type PC-3 du cancer de la prostate et cellules leucémiques T Jurkat (Fimognari *et al.* 2004 ; Singh *et al.* 2004)) ou en phase G1/S (sur cellules HT-29 de l'adénocarcinome du colon (Keum *et*

al. 2004)). D'autre part, les molécules chimiopréventives, notamment les ITCs, peuvent également inhiber les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1, dont l'activation est associée au développement de la plupart des tumeurs malignes (Jeong *et al.* 2004). C'est cette inhibition qui serait à l'origine de la réduction de croissance du myélome observée *in vivo* chez la souris par l'ITC issu de la glucomoringine, produite par les graines de *Moringa oleifera* (Brunelli *et al.* 2010).

**(b)** Une forte induction des enzymes de détoxification des carcinogènes et des ROS, et de défense cellulaire dite de phase II (Zhu et Loft 2003 ; Keum *et al.* 2004 ; Hayes *et al.* 2008 ; Abdull Razis *et al.* 2011b).

**(c)** Enfin, certains ITCs empêchent la vascularisation des métastases en croissance en réduisant la production du facteur TNF- $\alpha$  (tumour necrosis factor- $\alpha$ ) et de l'oxyde nitrique lors d'expériences *in vitro* et *in vivo* (Thejass et Kuttan 2007).

Ces résultats suggèrent une activité antioxydante des GLSs et de leurs dérivés. De plus, il a été montré qu'un supplément d'allyl-isothiocyanate (AITC, dérivé de la sinigrine) dans la nourriture de souris réduit certains marqueurs du stress oxydant consécutif à l'irradiation dans le sérum (Chittezhath et Kuttan 2006). Toutefois, des travaux montrent également une activité pro-oxydante de certains dérivés de GLSs, notamment à de fortes concentrations (Papi *et al.* 2008 ; Valgimigli et Iori 2009 ; Hara *et al.* 2010).

### ***3.7. Diversité génétique inter populations de la voie de biosynthèse des glucosinolates chez *Arabidopsis thaliana****

*A. thaliana* est une dicotylédone annuelle de la famille des Brassicaceae. Elle est utilisée comme organisme de référence pour la recherche végétale fondamentale et appliquée ainsi que dans le domaine de l'évolution et la génétique. Son génome diploïde relativement petit, environ 150 Mb répartis sur 5 chromosomes, fût le premier génome de plante entièrement séquencé en 2000 (voir les 4 publications dans Nature ; Salanoubat *et al.* 2000 ; Tabata *et al.* 2000 ; The Arabidopsis Genome Initiative 2000 ; Theologis *et al.* 2000) ce qui a permis le développement de nombreux outils génétiques et bioinformatiques et l'a placée parmi les modèles végétaux les plus populaires (3936 publications répertoriées sur Pubmed en 2010). Depuis novembre 2010, la version 10 de l'annotation du génome d'*A. thaliana* est disponible sur le site internet « The Arabidopsis Information Resource » (TAIR ; <http://arabidopsis.org/index.jsp>). Par ailleurs, sa petite taille, son cycle de développement court (8 semaines environ) et sa capacité à s'autoféconder rendent sa culture facile en laboratoire.

Cette espèce originaire d'Asie centrale a aujourd'hui colonisé la plupart des régions tempérées de l'Eurasie et plus récemment l'Amérique du Nord. Sa dispersion a abouti à une grande diversité d'écotypes naturels, nommés selon le lieu où ils ont été récoltés et dont les semences sont disponibles dans des banques de ressources génétiques végétales. Si le génome *A. thaliana* de référence est aujourd'hui celui de l'écotype Columbia-0 (Col-0), le séquençage du génome complet de 1001 autres lignées est actuellement en cours afin d'appréhender la variabilité génétique naturelles de cette espèce (Weigel et Mott 2009).

Toutefois, cette variabilité a déjà été étudiée sur un nombre plus restreint d'écotypes pour évaluer le polymorphisme existant dans les gènes impliqués dans la biosynthèse et l'hydrolyse des GLSs (Kliebenstein *et al.* 2001 ; Lambrix *et al.* 2001). 39 écotypes ont ainsi été regroupés en 7 groupes en fonction de leurs profils en GLSs et leur génotypage a permis d'identifier les 3 loci responsables de cette diversité : *elong*, *AOP* et *GS-OH* (Kliebenstein *et al.* 2001). De même, 122 écotypes ont été caractérisés en fonction du type de molécules majoritairement obtenues après dégradation enzymatique des GLSs qui dépend du locus codant pour l'épithioprotéine ESP qui oriente l'hydrolyse des GLSs vers les nitriles plutôt que vers les isothiocyanates (ITCs) (Lambrix *et al.* 2001). Pour ce travail, 11 écotypes ont été choisis selon leur génotype aux 4 loci identifiés dans ces travaux, afin d'étudier l'influence des GLSs endogènes dans la réponse aux radiations (Figure 7).

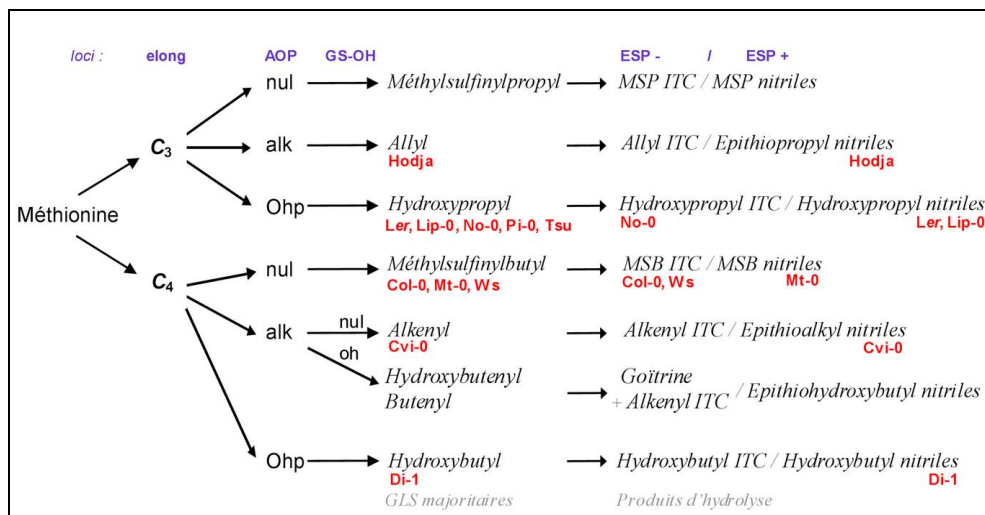


Figure 7 – Polymorphisme génétique de la voie de biosynthèse et d'hydrolyse des glucosinolates chez *A. thaliana* d'après Kliebenstein *et al.* 2001 et Lambrix *et al.* 2001 (en rouge, les écotypes utilisés dans ce travail).

Les GLSs d'*A. thaliana* proviennent des dérivés de la méthionine, du tryptophane et de la phénylalanine. Les semences dormantes ou en début de germination possèdent les concentrations les plus importantes en GLSs, suivies des inflorescences, des siliques, des

feuilles puis des racines (Brown *et al.* 2003). Les travaux de Petersen *et al.* (2001) montrent une augmentation de la teneur en GLSs totale chez *A. thaliana* Col-0 au cours de son développement. Entre la germination et la floraison, les feuilles accumulent majoritairement des GLSs aliphatiques alors que les racines accumulent plutôt les GLSs indoliques dans le même temps. Cet écotype ne possède qu'un seul GLS aromatique (le 2-phényléthyl-GLS) qui est présent en quantité infime dans les feuilles à partir du stade 1.06, dans les siliques et la graine mature.

Le modèle *A. thaliana* s'est donc imposé logiquement pour conduire ce travail sur la réponse des plantes aux radiations ionisantes et le rôle des GLSs dans la réponse antioxydante, à la fois en tant que modèle de laboratoire et du fait de sa composition en GLSs déjà largement étudiée.

Une approche de génomique fonctionnelle a d'abord été choisie pour étudier l'effet des radiations ionisantes sur *A. thaliana*, au niveau protéomique puis au niveau transcriptomique (résultats dans le premier chapitre).

Ensuite, compte tenu du nombre important de combinaisons possibles des teneurs en GLSs de cette plante, une approche technologique plus simple a été choisie pour évaluer l'effet des GLSs dans la réponse antioxydante (résultats dans le second chapitre).





## *Matériel et méthodes*

---



## 1. Matériel végétal

### 1.1. *Arabidopsis thaliana*

#### 1.1.1. *Ecotypes naturels*

Les semences des écotypes d'*A. thaliana* ont été commandées au Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, <http://arabidopsis.info/>) : Cvi-0 (Cap Verde Island, N902), Hodja (Khurmatov, N922), Col-0 (Colombia, N1092), Di-1 (Dijon, N1108), Lip-0 (Lipowiec, N1336), Mt-0 (Martuba, N1380), No-0 (unknown, N1394), Pi-0 (Pitztal, N1454), Ws (Wassilewskija, N1602), Tsu-1 (Tsu, N1640), *Ler* (Landsberg *erecta*, N1642).

Dans la suite de ce travail, les stades phénologiques de cette espèce sont souvent codés selon la nomenclature établie par Boyes *et al.* (2001) (Tableau 3).

Tableau 3 – Nomenclature des stades de développement chez *A. thaliana* d'après Boyes *et al.* (2001).

stade	Description
0.10	Imbibition de la graine
0.50	Emergence de la racine
0.7	Emergence de l'hypocotyle et des cotylédons
	<b>Développement des feuilles</b>
1.0	Cotylédons complètement ouverts
1.02	2 Feuilles de la rosette >1mm
1.03	2 Feuilles de la rosette >1mm
1.04	4 Feuilles de la rosette >1mm
1.05	...
...	...
1.14	14 feuilles de la rosette >1mm
	<b>Croissance de la rosette</b>
3.20	Rosette à 20% de sa taille finale
3.50	Rosette à 50% de sa taille finale
...	...
	<b>Emergence de l'inflorescence</b>
5.10	Premier bourgeon floral visible
	<b>Floraison</b>
6.0	Première fleur ouverte
6.10	10% des fleurs produites ouvertes
6.20	20% des fleurs produites ouvertes
...	...
6.90	Floraison complète
	<b>Maturation des siliques</b>
8.00	Première silique ouverte
	<b>Sénescence</b>
9.70	Sénescence complète (récolte des graines)

#### 1.1.2. *Mutants de la voie de biosynthèse des glucosinolates*

Trois mutants d'*A. thaliana*, obtenus par insertion d'ADN de transfert, et mutés au niveau de gènes de la voie de biosynthèse des GLSs ont été utilisés (Figure 8). Les semences de deux d'entre eux proviennent du NASC : N653619 (SALK\_113460C, mutant C-S lyase *sur1*, At2g20610) et N636312 (SALK\_136312, mutant *myb28*, At5g61420). Ces lignées

homozygotes à mutation unique ont été générées par infiltration sous vide du vecteur *Agrobacterium tumefaciens* pROK2 sur l'écotype Colombia (Alonso *et al.* 2003). Le double mutant homozygote *cyp79B2/B3* (gènes At4g39950 et At2g22330) sur fond Ws a été fourni par le Professeur John Celenza de l'université de Boston (Zhao *et al.* 2002).

Le mutant *sur1* ne produit pas de GLSs, le mutant *myb28* ne produit pas de GLSs aliphatiques et le double mutant *CYP79B2/B3* ne produit pas de GLSs indoliques (Figure 8).

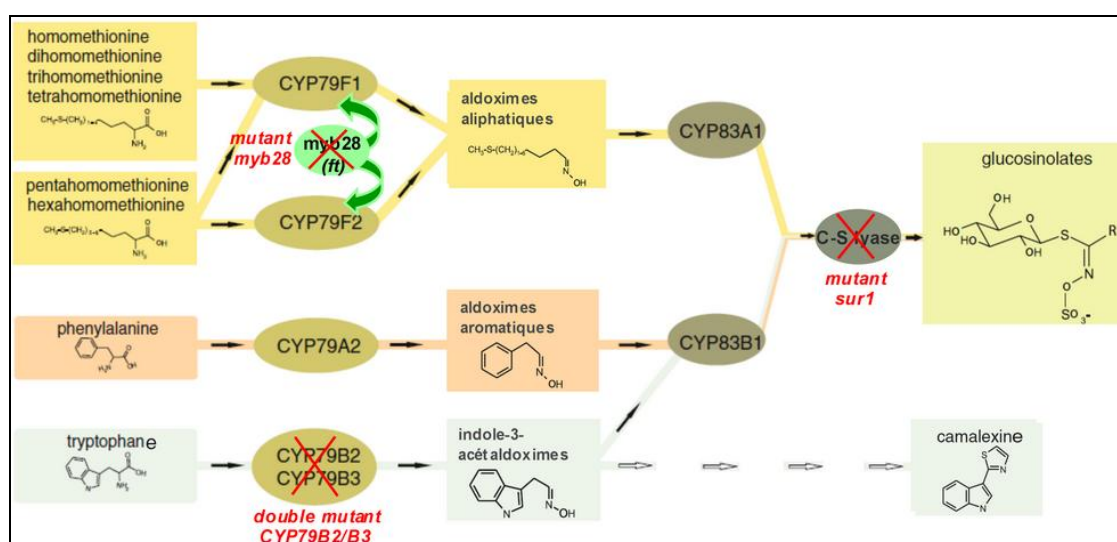


Figure 8 – Mutants de la voie de biosynthèse des glucosinolates caractérisés chez *A. thaliana* et utilisés dans la thèse (d'après Nafisi *et al.* 2006, avec modifications), *ft* = facteur de transcription.

### 1.1.3. Suspensions cellulaires

Les suspensions cellulaires sont plus facilement renouvelables à partir de cals cultivés en boîtes de Pétri. Le protocole utilisé pour l'obtention des cals et des suspensions cellulaires est celui décrit par Encina *et al.* (2001) avec quelques modifications dans les teneurs en hormones de croissance des milieux afin d'améliorer la croissance des cellules.

Les cals sont obtenus à partir de feuilles ou de racines de plantules d'*A. thaliana* de 10 jours cultivées en boîtes de Pétri stériles (conditions de culture : cf M&M – 2.). La mise en culture des explants se fait sous une hotte à flux laminaire et les plantes sont manipulées avec des outils stériles. Les parties aériennes et les racines des plantes d'une même boîte sont séparées. Les racines sont regroupées ensemble et hachées grossièrement tandis que les feuilles sont blessées superficiellement au scalpel. Les explants, feuilles mutilées ou amas de racines, sont disposés de façon espacée dans des boîtes de Pétri rondes (diamètre 8.5 cm) contenant 25 mL de milieu de culture stérile composé de MS (milieu de Murashige & Skoog,

Sigma M5519) 1X contenant 0,8% d'agar, 30 g.L<sup>-1</sup> de saccharose, 0,2 g.L<sup>-1</sup> de myoinositol (Merck 1.04507), 1 mg.L<sup>-1</sup> d'acide naphthalène acétique (NAA, Nutritional Biochemistry Inc.), 1 mg.L<sup>-1</sup> d'acide indolyl-3-acétique (AIA, Hoffmann-La Roche SA), 1 mg.L<sup>-1</sup> d'acide 2,4-dichloro-phénoxyacétique (2,4-D, Aldrich Chemie) et 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de benzylaminopurine (BAP, Sigma B9395). Les hormones de croissance (NAA, AIA, 2,4-D et BAP) sont préparées en solution de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Le NAA doit être dissout au vortex dans 500 µL de NaOH 1 M, l'AIA, le 2,4-D dans 500 µL d'éthanol à 95% et la BAP dans 500 µL d'acide acétique glacial avant d'être dilués dans de l'eau stérile. Les solutions d'hormones sont ajoutées en dernier dans le milieu avant l'ajustement du pH à 5,7 et la stérilisation (autoclave 1 bar, 15 min). Les boîtes contenant les cals sont scellées avec du film plastique et sont mises en culture à 22°C à l'obscurité. Les cals sont nettoyés des parties nécrosées et repiqués une fois par mois sur du milieu frais (Figure 9).

Les suspensions sont obtenues à partir d'1 g de cal (voir paragraphe précédent). Prélevé en conditions stériles, celui-ci est plongé dans 50 mL de milieu de culture liquide contenu dans un Erlen de 100 mL. Le milieu est identique à celui utilisé pour la culture des cals mais sans agar. Les Erlen sont bouchés avec du coton cardé enroulé dans de la gaze (stérile) et sont incubés à 23°C, à l'obscurité, sur un agitateur orbital (vitesse de rotation : 150 rpm pendant 24 h pour dissocier les tissus des cals puis 100 rpm). Les cultures sont repiquées toutes les quatre semaines : après homogénéisation de la culture par agitation douce, 10 mL sont prélevés dans un Erlenmeyer en prenant soin d'éviter les morceaux de cals et le volume est complété à 50 mL avec du milieu frais. Les cultures de racines sont obtenues en poursuivant la culture tout en supprimant le NAA et la BAP du milieu.



Figure 9 – Cultures de cals et suspensions cellulaires d'*A. thaliana*.

## 1.2. Autres modèles végétaux utilisés

### *Allium cepa*

Les semences d'*Allium cepa* L. (oignon) utilisées proviennent d'une variété de « graines à germer » (legume 631) de chez Thompson & Morgan.

### *Pisum sativum*

Le cultivar de l'espèce *Pisum sativum* L. (pois) utilisé est Baccara (Florimond Desprez) qui est un pois fourrager protéagineux et dont les semences ont été obtenues auprès de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA).

## 2. Semis et culture des différentes espèces végétales ; complémentation des milieux de culture en glucosinolates et antioxydants

La stérilisation des semences ainsi que leur mise en culture sont réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire.

Les semences d'*A. thaliana* sont stérilisées pendant 7 min dans une solution à 2% de Bayrochlore (dichlorocyanate de sodium, Bayrol, France) dans de l'éthanol 48%, puis elles sont rincées deux fois très rapidement à l'éthanol 96% et laissées à sécher sous la hotte pendant une nuit. Elles sont ensuite semées sur un rang dans des boîtes de Pétri carrées (12 cm x 12 cm) contenant un milieu gélosé stérile à raison de 25 graines par rang. Après des essais préliminaires, le milieu Murashige & Skoog (MS) à une concentration de 0,5X avec un supplément de 0,5% de saccharose (Sigma S5391) et 0,8% d'agar (Sigma A1296) a été retenu pour les expériences car il permet d'obtenir une meilleure croissance et une meilleure homogénéité des plantules d'*A. thaliana*. Les boîtes de Pétri sont scellées avec du film parafilm et placées à l'obscurité et à 4°C pour 3 jours de stratification à l'issue desquels elles sont transférées en chambre de culture (Percival invitrohydro) en position verticale. Les paramètres de culture sont les suivants : 22°C, cycle de 16 h de lumière par jour (intensité : 6500 lux, soit environ  $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et un taux d'humidité de 75%.

Les semences sont stérilisées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 3% de chlore actif pendant 3 min pour *P. sativum* et 1 min pour *A. cepa*. Elles sont ensuite rincées 5 fois

avec de grands volumes d'eau distillée stérile et sont laissées à imbiber dans l'eau distillée stérile une heure. Elles sont alors mises à sécher sous la hotte à température ambiante.

Les semences d'*A. cepa* sont semées dans des boîtes de Pétri rondes de diamètre 8,5 cm (40 graines par boîte) dont le fond est recouvert d'un papier Whatmann stérile, contenant 5 mL de milieu Hoagland liquide stérile (Sigma H2395) à une concentration de 0,5X et tamponné à pH 5,7 (tampon MES à 1 g.L<sup>-1</sup>, Sigma M8250 ; ajustement du pH avec KOH 1 M). Les boîtes sont scellées avec du parafilm et mises en culture en position horizontale, à l'obscurité pendant 4 jours à 22°C, puis dans une enceinte phytotronique dans les mêmes conditions que pour *A. thaliana*.

Les graines de *P. sativum* (9 graines sur un seul rang) sont semées dans des boîtes de Pétri carrées (12x12 cm) contenant 50 mL de milieu Hoagland stérile 0,5X (Sigma H2395), gélosé (0,8% d'agar, Sigma A1296) et tamponné à pH 5,7 (tampon MES à 1 g.L<sup>-1</sup>, Sigma M8250 ; ajustement du pH avec KOH 1 M). Les boîtes scellées sont placées comme précédemment en enceinte phytotronique en position légèrement inclinée.

Lors de certaines expériences, des apports exogènes de molécules ont été réalisés dans les milieux de culture des plantes. Parmi les molécules apportées figurent différents GLSs et certains de leurs dérivés ainsi que des composés reconnus pour leur propriété antioxydante ou pro-oxydante et qui ont servi de références (Tableau 4). Les GLSs testés sont des composés naturellement présents chez les choux-fleurs et les brocolis.

**Tableau 4 – Liste des molécules apportées dans les milieux de culture lors des expériences d'apports exogènes.**

Type de molécule	Nom de la molécule	référence
Glucosinolate (GLS)	Sinigrine	2-propenyl GLS Sigma S1647
	Glucotropaeoline	Benzyl GLS C2 Bioengineering N° 16-PM 19-10-99
	Glucobrassicine	Indol-3-ylmethyl GLS Phytoflan N° 3407.97
	Gluconapine	3-Butenyl GLS C2Bioengineering N° 2-PM 19-10-99
	Glucoraphanine	4-(Méthylsulfinyl)butyl GLS C2Bioengineering N° 11-JS 12-05-02
	Glucoibérine	3-(méthylsulfinyl)propyl GLS C2Bioengineering N° 10-JS 12-05-02
	Progoïtrine	2-(R)-2-Hydroxy-3-butényl GLS C2Bioengineering N° 4-JS 00
Dérivé de GLS	I3C	Indole-3-carbinol Sigma I7256
	AITC	Allyl-isothiocyanate Aldrich 377430
Antioxydant	Acide ascorbique L	Sigma A7506
	Glutathion	forme réduite Sigma G4251
Pro-oxydant	Tanacan	extrait de <i>Ginko biloba</i>
	CuCl <sub>2</sub>	Aldrich 222011

Les molécules sont préparées en solutions mères à des concentrations cinquante fois supérieures à la concentration finale voulue dans le milieu de culture, dans de l'eau distillée stérile. Ces solutions sont stérilisées par filtration (0,2 µm) sous la hotte à flux laminaire et

sont apportées dans le milieu de culture en conditions stériles à raison de 1 mL dans 50 mL de milieu. Pour les milieux gélosés, l'apport est réalisé dans le milieu tiède avec une étape d'homogénéisation juste avant le remplissage des boîtes de Pétri.

Les concentrations apportées dans les milieux de culture d'*A. thaliana* sont de 0, 0,1, 0,2, 0,5 et 1 mM de la molécule testée pour les apports exogènes dits de « fortes doses » et de 0,01, 0,1, 1 ou 10  $\mu\text{M}$  de la molécule testée pour les expériences d'apports exogènes dits de « faibles doses ». Pour les cultures de *A. cepa* et *P. sativum*, réalisées ultérieurement, les concentrations de molécules ajoutées dans le milieu ont été ajustées et sont de 0,01, 0,3, 10, 100 et 300  $\mu\text{M}$ .

### **3. Irradiation des plantes**

#### ***3.1. Protocole d'irradiation***

Les plantules sont irradiées au travers des boîtes de Pétri à l'aide d'un irradiateur à rayons X Faxitron 43855 A (Hewlett-Packard). L'enceinte de l'appareil est équipée d'une chambre de ionisations reliée à un dosimètre PTW UNIDOS<sup>®</sup> E (Freiburg, Allemagne) permettant de mesurer la dose réellement reçue au niveau de l'étagère où sont placés les échantillons. Le débit de dose au niveau de l'étagère vide est de 2,6 Gy.min<sup>-1</sup>. Un étalonnage de l'appareil avant chaque séance d'irradiation permet de calculer le rayonnement absorbé par la boîte de Pétri, le couvercle et le milieu de culture afin de délivrer la dose exacte choisie au niveau des plantules. De plus, les boîtes sont placées dans une zone uniforme du champ d'irradiation de manière à ce que la variation de dose de RI reçue n'excède pas 5% entre les plantes. Les boîtes de Pétri « contrôles » contenant les plantes non irradiées (0 Gy) sont maintenues à l'obscurité pendant un temps équivalent à celui de l'irradiation. Après irradiation, toutes les boîtes de Pétri sont remises en culture dans les mêmes conditions que précédemment pour la poursuite du développement des plantes.

#### ***3.2. Temps d'exposition aux RI pour les différentes cultures***

Le débit moyen de l'irradiation reçue au niveau des plantes varie selon les différentes espèces étudiées du fait des différences dans le mode de culture (milieux de nature différente, liquides ou solides, boîtes de Pétri de formats différents). Pour obtenir la même dose, le temps d'irradiation a donc du être adapté pour chaque espèce en fonction du débit de dose (Tableau 5).



Tableau 5 – Débit de dose utilisé pour calculer les temps d'expositions aux radiations ionisantes appliqués en fonction de l'espèce végétale considérée.

Dose	<i>A. thaliana</i>	<i>P. sativum</i>	<i>A. cepa</i>
Débit dose au niveau des échantillons	1,7 Gy.min <sup>-1</sup>	1,66 Gy.min <sup>-1</sup>	1,9 Gy.min <sup>-1</sup>

#### 4. Suivi de la croissance racinaire

Pendant la période de culture, la longueur de chaque racine est marquée quotidiennement sur le fond de la boîte de Pétri. Toutes les boîtes de Pétri sont photographiées (Olympus MJU 780, mode macro, 3200x2400 pixels – Figure 10) avant la récolte des échantillons. Les racines sont ensuite mesurées sur photographies avec le logiciel imageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).



Figure 10 – Cultures en conditions stériles et contrôlées des différents modèles biologiques : (a) *A. thaliana* ; (b) *P. sativum* ; (c) *A. cepa*.

#### 5. Echantillonnage, détermination de la masse fraîche et de la masse sèche

Pour *A. thaliana*, après séparation des racines trop petites pour être pesées, les parties aériennes contenues dans chaque boîte de Pétri sont réunies en 3 lots d'environ 6 plantules (quantité minimale nécessaire pour une pesée précise). Après pesée de la matière fraîche (MF) des parties aériennes, les échantillons sont lyophilisés et la masse sèche (MS) déterminée. Les expériences étant réalisées en triplicata (3 boîtes), on dispose donc de 9 données par condition expérimentale.

Pour *A. cepa* et *P. sativum*, les parties aériennes et les racines des plantes sont séparées (cotylédons non récoltés). Les masses fraîches moyennes par plante sont déterminées pour

chaque boîte de Pétri. Pour *A. cepa*, chaque condition est réalisée en sextuplicata (6 boîtes). Pour *P. sativum*, les différentes conditions sont réalisées en quadruplicata (4 boîtes).

## 6. Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes

L'extraction des pigments peut se faire sur la MF ou sur les lyophilisats broyés, une vérification préliminaire ayant démontré que les résultats sont similaires. Les microtubes contenant les échantillons sont remplis de 1 mL d'acétone à 100% puis placés sur un agitateur rotatif pendant 10 min (les fragments de végétaux doivent être blancs). Les débris sont éliminés par centrifugation (5 min à 13000g) et les surnageants sont récupérés. La teneur en acétone est ramenée à 80% par ajout de 250 µL d'eau milliQ par tube et la DO des échantillons par rapport à l'acétone à 80% est mesurée à 470, 645 et 663 nm au spectrophotomètre à plaques (VERSAmax, Molecular Devices). Les extraits sont dilués avec de l'acétone 80% pour atteindre une absorbance maximale de 0,8. Les teneurs en pigments sont calculées en µg.mL<sup>-1</sup> selon les équations suivantes (Lichtenthaler et Wellburn 1983) :

$$\text{chlorophylle a :} \quad Ca = 12,21 DO_{663} - 2,81 DO_{645}$$

$$\text{chlorophylle b :} \quad Cb = 20,13 DO_{645} - 5,03 DO_{663}$$

$$\text{chlorophylles totales :} \quad C = Ca + Cb$$

$$\text{caroténoïdes totaux (xanthophylles + carotènes) :} \quad K = \frac{(1000 DO_{470} - 3,27 Ca - 104 Cb)}{229}$$

## 7. Détection des espèces réactives de l'oxygène par sonde fluorescente

### 7.1. Sondes utilisées

Les dérivés de la fluorescéines utilisés comme sonde sont les formes dichloro-dihydrofluorescéine (DCH<sub>2</sub>F) et carboxy-dichloro-dihydrofluorescéine (CDCH<sub>2</sub>F). Elles proviennent de chez Invitrogen (référence D399 et C400 respectivement).

### 7.2. Infiltration de la sonde sur cultures racinaires

Les racines sont prélevées dans les suspensions racinaires (cf I.1.5) et plongées dans 10 mL de solution de sonde DCH<sub>2</sub>F-DA à 50 µM dans du tampon phosphate de sodium à pH 6,15 sous agitation douce pendant 10 min. La sonde étant conservée dans du DMSO, la solution finale en contient également 0,1%. Les racines sont ensuite rincées rapidement avec du tampon sans sonde puis étalées dans une boîte de Pétri propre avec son couvercle et irradiées. Les échantillons témoins sont traités de la même façon et sont placés à l'obscurité pendant le temps équivalent à celui de l'irradiation. Les racines sont ensuite réhydratées dans 10 mL de

tampon pH 6,15. L'observation est réalisée lorsque la sonde a été oxydée, c'est à dire 25 min après le début du traitement aux rayons X.

### **7.3. Microscopie et photographie**

Les racines sont posées sur du papier absorbant puis étalées sur une lame de microscope. L'observation se fait en fluorescence à une longueur d'onde d'émission  $\lambda = 529$  nm et une longueur d'onde d'excitation  $\lambda = 470$  nm au grossissement  $\times 1000$  (Microscope Olympus BX41 ; Générateur de fluorescence Olympus U-RFL-T). Les photographies correspondantes sont réalisées avec un appareil numérique branché sur le microscope (Olympus E410, réglage en macro, High Quality, luminosité forte).

## **8. Extraction et quantification des glucosinolates du chou-fleur**

L'extrait de chou-fleur utilisé a été obtenu à partir de sous-produits non comestibles d'une production locale (Saint Pol de Léon, France), principalement des feuilles et dans une moindre proportion des tiges. Le matériel végétal a été congelé immédiatement après récolte et lyophilisé. Les myrosinases endogènes ont été inactivées par chauffage du lyophilysat à 100°C pendant 15 min. Puis les GLSs ont été extraits dans du méthanol à 70°C pour les mesures de la capacité antioxydante (100 mg de MS dans 1,5 mL, en triplicata). En parallèle, une extraction dans l'eau bouillante est réalisée en duplicata pour la quantification des GLSs (200 mg de MS dans 2 mL puis dans 1 mL d'eau). Un aliquote de 20  $\mu$ l de glucotropaeoline 5 mM est alors ajouté à chaque échantillon en début d'extraction comme standard interne pour le dosage HPLC. Les quantifications en GLSs ont été effectuées par l'entreprise Végénov - BBV (Bretagne Biotechnologie Végétale, Saint Pol de Léon).

Les teneurs en GLSs des extraits aqueux ont été déterminées par HPLC (deux analyses par extrait) en utilisant la norme ISO 9167-1: 1992(F) légèrement modifiée selon Kushad *et al.* (1999) pour l'extraction et selon Kiddle *et al.* (2001) pour le gradient d'élution HPLC. Les GLSs contenus dans l'extrait sont retenus dans une colonne échangeuse d'anion DEAE-Sephadex A-25, préalablement équilibrée avec de l'acide acétique 2 M et lavée à l'eau. Suit une étape de désulfatation (18 h à température ambiante) par ajout dans la colonne de sulfatase (extraite de *Helix Pomatia* ; en solution à 14,4 U mL<sup>-1</sup> dans l'eau). Les désulfoglucosinolates sont récupérés par élution avec 2 mL d'eau stérile et séparés par HPLC (module de separation Waters 2695 ; colonnes RP-18 Lichrospher et LichroCART 250-4, Merck, Darmstadt, Germany) avec un débit de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. La détection à 229 nm est réalisée avec un détecteur à photodiode 996 (Waters, Milford, MA). Le gradient d'élution est

le suivant : gradient linéaire de 0 à 4% d'acétonitrile (5 min), gradient linéaire de 4 à 40% d'acétonitrile (25 min) puis 100% d'acétonitrile (5 min). Les GLSs ont été identifiés par (1) une comparaison du temps de rétention avec celui du composé pur dans les mêmes conditions et (2) le spectre UV. Des données de HPLC couplé à la spectrométrie de masse ont été utilisées pour confirmer l'identification de certains composés.

## 9. Détermination de la capacité antioxydante *in vitro* des glucosinolates

Les capacités antioxydantes des GLSs (*cf* M&M – 2.3.), de leurs dérivés obtenus après hydrolyse par la myrosinase (EHDPS ; *cf* M&M – 9.5.), ainsi que celle d'un extrait de chou-fleur (*cf* M&M – 8.), sont évaluées selon quatre méthodes complémentaires basées sur différents mécanismes d'élimination des ROS. Pour chacune d'entre elles, les mesures ont été réalisées en triplicata et des courbes de calibration ont été réalisées en utilisant le trolox comme standard (dérivé de la vitamine E soluble dans l'eau). De plus, la vitamine C et le glutathion, deux antioxydants de référence, ont également été testés par ces méthodes.

Pour les quatre méthodes utilisées, la capacité antioxydante de chaque composé est exprimée en équivalent trolox (TE, *angl.* « *Trolox equivalent* »), qui représente le nombre de micromoles de trolox requis pour obtenir le même effet qu'une micromole de la molécule testée ou qu'un gramme de masse sèche pour le cas d'un extrait végétal. Le TE est toujours calculé dans la partie linéaire de la courbe de l'activité oxydante en fonction des concentrations utilisées (molécules ou extraits).

L'analyse statistique des résultats a été réalisée selon la méthode décrite dans la section M&M – 11.

### 9.1. Méthode de détermination à l'ABTS

Cette méthode est basée sur l'élimination du radical l'ABTS<sup>•+</sup> (diammonium 2,2'-azino-bis(3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonate)) qui est détectable par spectrophotométrie à 734 nm. Le protocole utilisé a été décrit par Re *et al.* (1999) et adapté en plaques 96 puits. Le radical ABTS<sup>•+</sup> est généré chimiquement en utilisant du persulfate de potassium ( $2 \text{ ABTS} + \text{S}_2\text{O}_8^{2-} \rightarrow 2 \text{ ABTS}^{\bullet+} + 2 \text{ SO}_4^{2-}$ ) et la disparition de l'ABTS<sup>•+</sup> en présence d'antioxydant est mesurée par spectrophotométrie (Molecular Devices spectrophotometer, Softmax Pro software). Chaque réaction est réalisée avec 290  $\mu\text{L}$  de solution d'ABTS<sup>•+</sup> et 10  $\mu\text{L}$  de solution de GLS, d'antioxydant ou d'extrait de chou-fleur. Les GLSs, la vitamine C et le glutathion ont été dissouts dans de l'eau distillée à des concentrations finales de 0 à 200  $\mu\text{M}$ . L'extrait de chou-fleur représente 0 à 83  $\mu\text{g}$  de masse sèche par puit. Le pourcentage de diminution de

l'absorbance en présence d'antioxydant ou d'extrait de chou-fleur a été calculé et exprimé en fonction de la concentration en antioxydant afin de calculer l'équivalent trolox dans la partie linéaire de la courbe.

### **9.2. Méthode de détermination au DPPH**

Cette méthode est basée sur la réduction du DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), un radical organique azoté stable, par un antioxydant AH ( $\text{DPPH}^{\bullet} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^{\bullet}$ ). Cette réduction est accompagnée d'un changement de couleur (du violet au jaune), suivi par une diminution de l'absorbance à 515 nm selon le protocole décrit par Brand-Williams *et al.* (1995) et adapté en plaques 96 puits. 10  $\mu\text{L}$  de solution d'antioxydant, de GLS ou d'extrait de chou-fleur préparés comme précédemment sont déposés dans chaque puits auxquels sont ajoutés 290  $\mu\text{L}$  de solution de DPPH<sup>•</sup> dissout dans le méthanol. La disparition du DPPH<sup>•</sup> est également exprimée en équivalent trolox.

### **9.3. Méthode ORAC (« oxygen radical absorbance capacity »)**

La méthode ORAC mesure la capacité d'un antioxydant à éliminer les radicaux peroxydes formés spontanément à partir de l'AAPH (2,2'-azobis[2-amidinopropane] dihydrochloride) dans une solution saturée en O<sub>2</sub> [ $\text{R-N=N-R}_{(\text{AAPH})} \rightarrow 2 \text{R}^{\bullet} + \text{N}_2$ ; puis  $\text{R}^{\bullet} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}^{\bullet}$ ]. Le protocole décrit par Ou *et al.* (2001), est basé sur l'interférence de l'antioxydant (AOH) dans la réaction de destruction de la fluorescéine (FL-H) par le radical peroxyde qui est suivie par spectrométrie fluorescente (spectrofluorometric analyser Synergy2, BioTek Instruments;  $\lambda$  excitation : 485 nm ;  $\lambda$  émission : 528 nm) :



Ce protocole est adapté en plaques 96 puits. Toutes les solutions sont préparées dans du tampon phosphate [75 mM, pH 7,4], avec des concentrations variant de 0 à 20  $\mu\text{M}$  pour les composés testés et de 0 à 3  $\mu\text{g}$  de masse sèche pour l'extrait de choux fleur. 20  $\mu\text{L}$  du composé testé ou de l'extrait de chou-fleur, sont incubés à 37°C en présence de 180  $\mu\text{L}$  de disodium de fluorescéine 70 nM. Puis 100  $\mu\text{L}$  d'AAPH à 37°C sont ajoutés pour initier la réaction. La fluorescence est enregistrée toutes les minutes pendant une durée de 2 h.

L'aire sous la courbe (ASC) nette est calculée en soustrayant l'ASC obtenue en présence d'antioxydant à l'ASC du blanc. La courbe de l'ASC nette a été tracée en fonction de la concentration en antioxydant et l'équivalent trolox a été calculé dans la partie linéaire de cette courbe.

#### **9.4. Méthode SRSA (« superoxide radical scavenging activity »)**

L'activité antiradicalaire des composés par rapport à  $O_2^{\bullet-}$  a été déterminée par la méthode décrite par Valentão *et al.* (2001) et adaptée en plaque 96 puits, basée sur l'inhibition de la réduction du NBT (sulfate de méthyl p-Nitrotétrazonium) en formazan par ce radical (NBT +  $O_2^{\bullet-}$  → Bleu formazan). Dans ce protocole,  $O_2^{\bullet-}$  est produit par l'oxydation de la xanthine (Xanthine +  $H_2O$  +  $2O_2$  (+ catalyseur : xanthine oxydase) → Acide urique +  $2 O_2^{\bullet-}$  +  $2 H^+$ ) et la réduction du NBT en formazan par  $O_2^{\bullet-}$  est suivie par spectrophotométrie à 560 nm (Molecular Devices, Softmax Pro).

#### **9.5. Production des EHDPS (« enzymatic hydrolysis-derived products »)**

Les EHDPS ont été obtenus par hydrolyse enzymatique des GLSs, mis en solution à des concentrations de 0 à 20  $\mu M$  dans du tampon phosphate 50 mM pH 6,5, par 0,274 unités de myrosinase (thioglucosidase extraite des graines de *Sinapis alba*, Sigma T4528) à 37°C (Nastruzzi *et al.* 1996). La réaction d'hydrolyse a été préalablement testée sur la sinigrine (concentration finale 25,9  $\mu M$ ), la disparition de la sinigrine étant suivie par son absorbance à 227 nm. Comme l'hydrolyse de la sinigrine était complète après 30 min, un temps de 45 min a été respecté pour l'hydrolyse des autres GLSs. Une unité myrosinase est définie comme la quantité d'enzyme capable d'hydrolyser 1  $\mu$ mole de sinigrine par min.

La capacité antioxydante des EHDPS a été déterminée par la méthode ORAC immédiatement après la fin de l'hydrolyse enzymatique. Pour ces expériences, les hydrolysats ont été chauffés à 100°C pendant 3 min puis immédiatement refroidis afin d'inhiber la myrosinase dont l'action pourrait interférer dans le dosage. Ils ont ensuite été dilués à des concentrations correspondant à la partie linéaire de la courbe représentant l'activité antioxydante en fonction de la concentration, également établie pour chacun des hydrolysats. D'autre part, des échantillons contrôles ont été réalisés en utilisant la myrosinase seule.

### **10. Dosage des activités enzymatiques antioxydantes chez *A. thaliana* et *A. cepa***

#### **10.1. Extraction des protéines solubles**

L'extraction des protéines solubles est réalisée à partir de 100 mg de matière fraîche broyée dans des microtubes, par 1 mL de tampon d'extraction (tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, PVPP 5%, 2-mercaptoéthanol 4 mM, ascorbate 5 mM, cocktail inhibiteur de protéases Sigma P9599 à 5  $\mu L \cdot mL^{-1}$  ajoutés au moment de

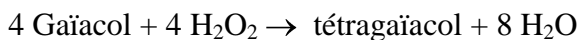
l'extraction). Les tubes sont placés sur un agitateur rotatif pendant 1 h à 4°C. Après centrifugation 20 min à 12000 g, les surnageants sont récupérés, aliquotés et conservés à -80°C. Ces extraits seront utilisés pour les mesures d'activité enzymatiques antioxydantes gaïacol peroxydase (GPX), glutathion réductase (GR) et superoxyde dismutase (SOD).

### **10.2. Dosage des protéines**

La teneur en protéines des extraits enzymatiques est déterminée selon la méthode colorimétrique de Bradford (Bradford 1976) adapté au spectrophotomètre à plaques. Le bleu de Coomassie contenu dans le réactif (bleu de Coomassie G 250 0,01%, éthanol 5% v/v, acide orthophosphorique 10% v/v, eau milliQ qsp) réagit avec l'arginine et dans une moindre mesure avec l'histidine, la lysine et les acides aminés aromatiques des protéines pour donner une couleur bleue dont l'intensité est mesurée par l'absorbance à 595 nm. La concentration en protéines est déterminée par rapport à l'albumine sérique bovine comme standard (0 à 30 µg.mL<sup>-1</sup>). Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

### **10.3. Mesure de l'activité gaïacol peroxydase (GPX)**

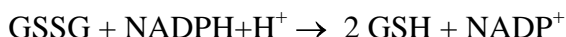
La GPX catalyse l'oxydation du gaïacol selon la réaction suivante :



Son activité est déterminée à partir de la vitesse maximum d'apparition du tétragaiacol (vitesse initiale de réaction en conditions saturantes en substrat), selon le protocole décrit par Srivastava et van Huystee (1977) adapté en plaques 96 puits. 5 ou 10 µL d'extrait enzymatique sont déposés dans chaque puits auxquels sont ajoutés 30 µL des solutions de tampon phosphate, de gaïacol et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> complétés à 300 µL avec de l'eau ultra-pure. Chacune des solutions est préparée à une concentration 10 X afin d'obtenir la composition du milieu réactionnel final : tampon phosphate de potassium 100 mM pH 6,5, gaïacol 15 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05% v/v. La réaction est initiée dès l'addition de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au mélange réactionnel. L'activité enzymatique est suivie en fonction du temps au spectrophotomètre VERSAmax (Molecular Devices) par mesure de l'absorbance à 470 nm (une mesure toutes les 15 secondes pendant 5 min à 25°C). La quantité de tétragaiacol formé par seconde est calculée à partir de la pente initiale (logiciel Softmax Pro) en utilisant la valeur de coefficient d'extinction de tétragaiacol,  $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Une unité d'activité GPX est définie comme la quantité d'enzyme produisant 1 µmol.min<sup>-1</sup> de tétragaiacol. Cette activité est rapportée en katal (1 katal = 1 mol.s<sup>-1</sup>) par mg de protéine.

#### **10.4. Dosage de l'activité glutathion réductase (GR)**

La GR catalyse la réaction de réduction du glutathion selon l'équation :



Son activité est déterminée à partir de la vitesse maximum de disparition du NADPH (vitesse initiale de réaction en conditions saturantes en substrat), selon le protocole décrit par Vanacker *et al.* (1998) adapté en plaques 96 puits. Cinquante ou 100  $\mu\text{L}$  d'extrait enzymatique sont utilisés additionnés comme précédemment des réactifs nécessaires pour obtenir la composition du milieu réactionnel final : tampon Hepes 50 mM pH 8, EDTA 0,5 mM, GSSG 0,5 mM, NADPH 0,25 mM. La réaction est initiée par l'ajout du NADPH+H<sup>+</sup>. L'activité enzymatique est suivie en fonction du temps par mesure de l'absorbance à 340 nm (une mesure toutes les minutes pendant 30 min à 25°C). La quantité de glutathion réduit par seconde est calculée à partir de la pente initiale en utilisant la valeur de coefficient d'extinction du NADPH à 340 nm,  $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Une unité d'activité GR est définie comme la quantité d'enzyme réduisant 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  de glutathion. Cette activité est rapportée en katal par mg de protéine.

#### **10.5. Dosage de l'activité superoxyde dismutase (SOD)**

La SOD inhibe la réduction photochimique du nitrobleu tétrazolium (NBT) par  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dont l'équation est :  $\text{NBT}_{\text{ox}} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{NBT}_{\text{red}}$

Son activité peut donc être déterminée en calculant le pourcentage d'inhibition de la réaction qui peut elle même être suivie par l'augmentation de l'absorbance à 560 nm selon le protocole décrit par Giannopolitis et Ries (1977) adapté en plaques 96 puits.

Cinq  $\mu\text{L}$  d'extrait enzymatique sont déposés dans chaque puits auxquels sont ajoutés 30  $\mu\text{L}$  de chacune des solutions 10 X de tampon phosphate de potassium, méthionine et NBT complétés à 300  $\mu\text{L}$  avec de l'eau milliQ. La composition du milieu réactionnel final est : tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,8, EDTA 0,1 mM, NBT 75  $\mu\text{M}$ , méthionine 13 mM, riboflavine 2  $\mu\text{M}$ . Afin de calculer le pourcentage d'inhibition, trois puits sont préparés avec l'ensemble des réactifs mais sans l'extrait enzymatique qui est remplacé par de l'eau distillée. Ils permettent de déterminer l'absorbance maximale du NBT après réduction photochimique. La réaction est initiée par l'ajout de la riboflavine et le mélange placé sous lumière blanche. Un produit violet se développe alors. La DO est mesurée à 560 nm avant la réaction photochimique et après 8 minutes de réaction sous la lumière.



Une unité d'activité SOD correspond à une inhibition de la réduction du NBT de 50%. L'activité SOD des extraits est donc calculée en appliquant les formules :

$$\text{Inhibition} = [(A_{560} \text{ max} - A_{560} \text{ échantillon}) / A_{560} \text{ max}] \times 100$$

$$\text{UA (unité d'activité) SOD / mg de protéines} = \text{inhibition} / (n \times 50)$$

n : mg de protéines présents dans le volume d'extrait utilisé

## 11. Traitement statistique des données

Les données sont représentées graphiquement sous Excel par leurs moyennes. Les barres d'erreurs représentent les écarts standards à la moyenne ( $sem = \text{écart type} / \sqrt{n}$ ) (Cumming *et al.* 2007).

Les données sont analysées avec le logiciel R version 2.7.1 (<http://www.r-project.org/>). La normalité et l'homoscédasticité (égalité des variances) des séries à comparer sont vérifiées respectivement par des tests de Shapiro et de Bartlett afin de déterminer si l'on peut comparer les résultats par des tests paramétriques ou non. Si les conditions de normalité et d'homoscédasticité sont vérifiées, la comparaison multiple des moyennes est effectuée par un test paramétrique d'analyse de variances (ANOVA) suivi d'un classement des moyennes de Tukey. Si les séries ne suivent pas une loi normale ou qu'elles ne présentent pas des variances égales, le classement des moyennes est réalisé par une comparaison non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW) suivie d'un classement par paire corrigé par l'ajustement de Holm-Bonferroni. Le classement des moyennes, qui donne les différences significatives entre toutes les conditions d'une expérience, est noté par les lettres « a » à « e » sur les graphiques. La moyenne de chaque condition d'irradiation est également comparée à la condition contrôle non irradiée (0 Gy) par des tests de Student (paramétrique) ou de Welch (non paramétrique) selon les conditions d'applicabilité. Les conditions significativement différentes du contrôle sont alors indiquées par le symbole \* sur les graphiques.

## 12. Etude protéomique

L'étude comparative et cinétique des changements intervenant au niveau du protéome d'*A. thaliana* a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Jesús Jorrín Novo au sein du département de Biochimie et Biologie moléculaire de l'Ecole d'Agronomie de Cordoue (Espagne), spécialiste en protéomique végétale. Ce projet a reçu l'appui d'un financement européen COST-STSM-FA0603 « Plant Proteomics ».

### **12.1. Echantillons et cinétiques**

Les plantules d'*A. thaliana* ont été cultivées en conditions contrôlées comme décrit au paragraphe I.2.1. Elles ont été irradiées au stade de croissance 1.02 avec des doses de 10 ou 40 Gy (voir le protocole d'irradiation à la section I.3). Les plantules sont récoltées 2 h, 24 h et 72 h après irradiation et les parties aériennes et les racines sont séparées, afin d'obtenir des cinétiques post-irradiation pour les deux types de tissus. Les échantillons des parties aériennes sont notés « *leaves* » et les échantillons racines sont notés « *roots* ». En parallèle, des plantules cultivées dans les mêmes conditions et non irradiées ont été récoltées de la même façon et constituent les échantillons contrôles 0 Gy. Tous les échantillons ont été congelés dans l'azote liquide, conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  puis lyophilisés pour l'extraction des protéines. Pour les échantillons « *leaves* », des triplicatas biologiques ont été obtenus pour les trois temps. Pour les échantillons « *roots* », la biomasse étant insuffisante, le matériel correspondant aux trois temps 2h, 24h et 72h a été rassemblé et la comparaison du protéome a été menée entre les différentes doses d'irradiation afin de conserver les répétitions biologiques nécessaires à l'analyse.

### **12.2. Extraction et quantification des protéines**

L'extraction des protéines a été réalisée par la méthode TCA-acétone/phénol (Wang *et al.* 2006) sur des lyophilisats d'environ 20 à 30 mg de matière sèche (MS). Chaque échantillon est réduit en poudre dans un microtube de 2 mL placé dans la glace puis homogénéisé dans 1,8 mL d'acétone-TCA 10%. Toutes les solutions utilisées lors de l'extraction sont conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Après centrifugation, le culot est rincé avec du méthanol à 80% contenant de l'acétate d'ammonium 0,1 M, puis à l'acétone 80%. Les protéines sont extraites des culots secs avec 600  $\mu\text{L}$  de tampon SDS [saccharose 30%, SDS 2%, Tris-HCl 0,1 M pH 8, 2-mercaptoéthanol 5%] et addition d'un même volume de phénol tamponné à pH 8. Après 5 minutes à  $0-4^{\circ}\text{C}$  et centrifugation, la phase phénolique supérieure est transférée dans un nouveau tube. Les protéines sont précipitées toute la nuit à  $-80^{\circ}\text{C}$  avec du méthanol 100% contenant de l'acétate d'ammonium 0,1 M. Le surnageant est éliminé et le culot rincé avec du méthanol à 100% puis de l'acétone à 80%. Les protéines obtenues sont alors dissoutes dans du tampon de solubilisation [Urée 7 M, Thiourée 2 M, CHAPS 4%, Triton X-100 2%, DTT 100 mM] sous agitation énergique. Les échantillons « *leaves* » sont dissouts dans 200  $\mu\text{L}$  de ce tampon et les échantillons « *roots* » dans 100  $\mu\text{L}$  seulement. La quantité de protéines est déterminée par un dosage de Bradford. La qualité de l'extraction est vérifiée sur un gel SDS-PAGE sur lequel sont déposés 10  $\mu\text{g}$  de protéines (système Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Bio-Rad, gel

d'acrylamide 12%, tension de migration 120 V) et sur lequel on peut observer la présence et l'intensité des différentes bandes attendues.

### **12.3. Electrophorèse bidimensionnelle**

Les gels d'électrophorèse bidimensionnelle (2D-E) qui ont servi pour l'analyse comparative du protéome d'*A. thaliana* ont été réalisés avec 300 µg de protéines par gel pour les échantillons « *leaves* » et 400 µg par gel pour les échantillons « *roots* ».

L'électrofocalisation (IEF) a été réalisée avec des gels de polyacrylamide longiformes de 17 cm (Bio-Rad) et de gradient de pH 5-8, sur le système Protean IEF Cell<sup>®</sup> (Bio-Rad). Les protéines, en suspension dans un tampon contenant de l'urée 7 M, du thiourée 2 M, 4% de CHAPS, 0,005% de bleu de bromophénol, 0,2% d'ampholytes (Bio-Lyte 3/10, Bio-Rad) et 100 mM de DTT, ont pénétré les gels sous tension (50 V) pendant 16 h. Par la suite, les paramètres de tension appliqués lors de l'IEF sont : 0 à 10000 V jusqu'à 50000 V.h<sup>-1</sup>. Puis les gels d'IEF sont équilibrés dans deux bains successifs de solution Tris-HCl 375 mM pH 8,8, urée 6 M, SDS 2%, glycérol 20%, le premier bain contenant 2% de DTT et le second 2,5% de iodoacetamide. La séparation des protéines dans la seconde dimension est réalisé sur des gels SDS-PAGE à 12% d'acrylamide dans une cuve à plaques verticales (PROTEAN Plus Dodeca Cell<sup>®</sup>, Bio-Rad) permettant la migration simultanée sur 12 gels avec une tension de 120 V (tampon de migration : Tris-HCl 0,025 M, glycine 0,192 M, SDS 0,1%, pH 8,3).

Les gels sont colorés par la méthode au bleu de Coomassie colloïdal : ils sont plongés 24 h dans une solution composée de bleu de Coomassie G-250 à 0,14%, d'acide phosphorique à 2,6%, de sulfate d'ammonium à 11% et de méthanol à 27,5%. Ils sont ensuite rincés 3 min avec du tampon Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M pH 6,5, et 1 min avec du méthanol à 25%, avant l'étape de décoloration qui consiste en un lavage dans le phosphate d'ammonium à 20% pendant 24 h. La coloration est répétée une seconde fois.

### **12.4. Analyse comparative des gels**

Les gels 2D-E sont scannés puis la comparaison quantitative des spots homologues réalisée sur images avec le logiciel PDQuest v 8.0.1 (Bio-Rad). L'analyse des images comprend une étape d'homogénéisation des gels (nettoyage, découpe et filtrage) et une étape de reconnaissance et d'annotation des spots homologues sur les différents gels. Cette dernière est faite de façon automatique dans un premier temps, puis la liste est révisée manuellement spot

par spot. La normalisation des quantités de protéines présentes (en unité relative arbitraire en ppm) est réalisée avec la méthode « Local regression method » (LOESS). Cette méthode, disponible sur le logiciel PDQuest v 8.0.1, calcule un facteur de normalisation à partir d'une courbe de dispersion des points qui minimise la distance à tous les points du gel.

### **12.5. Analyse statistique**

Les valeurs obtenues pour chaque spot sont transformées en racines cubiques (Excel) afin d'ajuster la dispersion des triplicatas à une loi normale et de stabiliser leurs variances. La significativité des variations de chaque spot entre les différentes conditions d'irradiation pour un même temps de la cinétique est testée par un test ANOVA ( $p < 0.05$ ), suivi par un classement des moyennes par test de Duncan si les différences sont significatives. Le logiciel d'analyse statistique utilisé est SPSS v 17.0 qui permet le traitement de cent séries simultanément. Dans un second temps, la liste des spots significatifs est réduite par le test FDR (« false discovery rate ») selon Benjamini et Hochberg (1995).

Afin de mieux visualiser l'amplitude des variations négatives et positives des spots variants, les ratios des six comparaisons 2h\_10Gy/2h\_0Gy, 24h\_10Gy/24h\_0Gy, 72h\_10Gy/72h\_0Gy, 2h\_40Gy/2h\_0Gy, 24h\_40Gy/24h\_0Gy et 72h\_40Gy/72h\_0Gy sont transformés en  $\log_2$ .

### **12.6. Identification des protéines**

L'identification des protéines contenues dans les spots variants par spectrométrie de masse a été réalisée par la plateforme du SCAI (Servicio Central de Apoyo a la investigación) de l'Université de Rabanales de Cordoue, membre du réseau ProteoRed-ISCIH.

Les spots sont excisés manuellement des gels puis conservés dans de l'eau distillée en microtubes à 4°C. Ils sont ensuite transférés en microplaques 96 puits pour la digestion enzymatique par la trypsine porcine modifiée (Promega) en utilisant une station de digestion ProGest (Genomics Solution). Le protocole de digestion utilisé est décrit dans Maldonado *et al.* (2008). Les fragments de gels sont décolorés par incubation (deux fois 30 min) dans une solution de bicarbonate d'ammonium 200 mM dans de l'acétonitrile 40% à 37°C, puis ils sont soumis à trois cycles de déshydratation/réhydratation consécutifs avec de l'acétonitrile pur et une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM dans de l'acétonitrile 40% respectivement, et, finalement, séchés à température ambiante pendant 10 min. La digestion est réalisée à 37°C pendant 12 h après ajout de 20  $\mu$ L de la solution de trypsine (concentration finale de 12,5 ng/ $\mu$ l dans du bicarbonate d'ammonium 25 mM) sur les fragments de gel secs. Les

peptides sont ensuite extraits des fragments de gel avec un mélange d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,5% acétonitrile 50% (15 min d'incubation), séchées sous vide et remis en suspension dans 10 µL de TFA 0,1%. Un tiers de chaque échantillon a été purifié par ZipTip et déposé sur une plaque MALDI en utilisant de l'acide  $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamique comme matrice à la concentration de 5 mg.mL<sup>-1</sup> dans l'acétonitrile 70% / TFA 0,1% (dépôt en « dry droplet » ProMS, Genomic Solutions).

Les peptides résultants sont analysés par spectrométrie de masse MALDI/TOF-TOF à l'aide d'un spectromètre 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). Le repérage des pics est réalisé avec un seuil S/N = 10, une largeur de fenêtre de bruit local (m/z) = 250 et une largeur à mi-hauteur de pic minimum = 2. La calibration interne du spectre est réalisée sur les pics issus de l'autolyse de la trypsine (842.51, 1045.56 et 2211.11). Les données de masse sont analysées avec le logiciel 4000 Series Explorer v 3.5.3 (Applied Biosystems). Les protéines sont identifiées par une stratégie combinée d'une recherche d'empreinte massique de peptide et d'une recherche MS/MS d'au moins douze ions peptidiques, en utilisant le logiciel GPS Explorer™ software v 3.5 (Applied Biosystems) dans la base de données NCBI nr et le moteur de recherche MASCOT v 1.9 (<http://www.matrixscience.com>). Les paramètres appliqués sont les suivants : restriction taxonomique aux Viridiplantae, un seul « missed cleavage » autorisé, tolérances de masses de 100 ppm pour la MS et de 0,2 Da pour les ions issus de la fragmentation, carbamidométhylation de la cystéine comme modification fixée et oxydation de la méthionine comme modification variable. La valeur de score limite était de 69 (pour assurer une probabilité p<0.05). Les résultats des scores MASCOT sont donnés dans le matériel supplémentaire de l'article de Gicquel *et al.* (2011) (Annexe 1 – Table S5). Seules les protéines annotées chez *A. thaliana* ont été prises en considération.

### ***12.7. Exploration et analyse des résultats***

Les catégories fonctionnelles des gènes exprimés de manière différentielle sont définies en fonction des catégories définies par le MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences) dont le catalogue est disponible sur le site de l'institut de bioinformatique de l'Helmholtz Zentrum München :

([http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search\\_main\\_frame.html](http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html))

Afin d'analyser les niveaux d'expression des protéines aux travers de l'expérience, les ratios des valeurs obtenues en condition d'irradiation (10 ou 40 Gy) sur les valeurs obtenues en condition contrôle pour un même temps sont calculés pour chaque spot. Ces ratios sont

ensuite transformés en  $\log_2$  pour mieux visualiser l'amplitude relative des sur- et sous-expression.

### **13. Etude de transcriptomique**

L'étude comparative du transcriptome d'*A. thaliana* par puce CATMA en réponse aux radiations ionisantes a été réalisée en collaboration avec l'Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV) de l'INRA d'Evry (UMR INRA 1165-CNRS).

#### ***13.1. Conditions de cultures, irradiations et cinétiques de réponse***

Les conditions de cultures des plantules d'*A. thaliana* sont celles décrites au paragraphe I.2.1. Les plantes sont exposées à des doses de 10 et 40 Gy selon le protocole décrit à la section I.3. Des plantes non irradiées traitées dans les mêmes conditions constituent le contrôle 0 Gy. Les plantes sont récoltées 2 h et 26 h après irradiation et sont congelées entières dans l'azote liquide. Les échantillons, nommés CT-2h et CT-26h (contrôles non irradiés), IR10-2h et IR10-26h (10 Gy), IR40-2h et IR40-26h (40 Gy), et obtenus en duplicatas biologiques indépendants pour toute les conditions, sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction des ARN.

#### ***13.2. Extraction des ARN***

L'extraction des ARN est réalisée avec le Kit « RNeasy Plant Mini Kit » (Qiagen, tampon de lyse guanidine thiocyanate RLT). Les ARN sont récupérés dans environ 50  $\mu\text{L}$  d'eau « RNase free » et la quantité d'acides nucléiques contenue dans chaque échantillon est quantifiée par spectrophotométrie à 260 nm (NanoDrop<sup>®</sup> ND 1000). La courbe de DO de l'échantillon dans l'UV ainsi que le ratio des DO à 260 nm et 280 nm permettent de vérifier l'absence de contaminants. Les ARN sont ensuite précipités pendant 30 minutes par ajout de 2 volumes d'éthanol à 100% (par rapport au volume d'éluât issu de l'extraction) et 1/10<sup>ème</sup> de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot contenant les ARN est immédiatement transmis à l'URGV par colis réfrigéré (carboglance).

#### ***13.3. Réalisation de la puce à ADN et des hybridations***

La micropuce utilisée pour l'analyse transcriptomique est une puce CATMA contenant 24577 sondes spécifiques du génome d'*A. thaliana* (Hilson *et al.* 2004). Elle a été réalisée selon le protocole décrit par Lurin *et al.* (2004). Les amplicons des marqueurs de séquences spécifiques de gènes (« gene-specific sequence tags ») ont été purifiés sur des microplaques

Multiscreen (Millipore, Bedford, MA) et re-suspendus dans du tampon Tris EDTA DMSO à  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Les sondes purifiées ont été transférées dans une plaque 1536 puits à l'aide de la station de travail Genesis (TECAN, Männedorf, Sweden) et déposées sur une lame UltraGAPS (Corning, Corning, NY) en utilisant un Microgrid II (Genomic Solution, Huntingdon, UK). La puce CATMA éditée à l'URGV est constituée de trois « métablocs », chacun comprenant 64 blocs de 144 spots.

Les ADN<sub>C</sub> sont obtenus à partir de  $2 \mu\text{g}$  d'ARN totaux de chaque échantillon à l'aide du kit MessageAmp™ aRNA (Ambion, Austin, TX). Puis une transcription inverse est réalisée sur  $5 \mu\text{g}$  d'ADN<sub>C</sub> en présence de 300 unités de SuperScript II (Invitrogen), cy3-dUTP et cy5-dUTP (NEN, Boston, MA) pour chaque lame comme décrit dans Puskas *et al.* (2002). Les échantillons sont combinés, purifiés, et concentrés sur une colonne Microcon YM30 (Millipore). Les lames sont pré-hybridées pendant 1 h puis hybridées toute une nuit à  $42^\circ\text{C}$  dans du formamide 25%. Les lames subissent ensuite trois lavages consécutifs de 4 min dans du tampon SSC (Sigma) à des concentrations décroissantes (SSC 2X + 0,1% SDS, SSC 1X, SSC 0,2X) et un lavage d'une minute dans du tampon SSC 0,05X avant d'être séchées par centrifugation. Seize hybridations sont réalisées sur la base des quatre comparaisons suivantes (réalisées sur les lames), IR10-2h/CT-2 h, IR40-2h/CT-2h, IR10-26h/CT-26h et IR40-26h/CT-26h, et en incluant les deux répétitions biologiques indépendantes et un dye-swap. Finalement les puces sont scannées sur un scanner GenePix 4000A (Axon Instruments, Foster City, CA) et les images analysées avec le logiciel GenePix Pro 3.0 (Axon Instruments).

#### **13.4. Analyse statistique des données de puce à ADN**

Les statistiques ont été réalisées par l'équipe de l'URGV sous le logiciel R selon une méthode standardisée décrite dans Gagnot *et al.* (2008). Les données complètes issues de cette analyse sont disponibles en ligne dans la base de données CATdb (<http://www.urgv.evry.inra.fr/CATdb/> ; numéro d'accèsion : AU09-03).

Les données brutes des spots (logarithmes des intensités médianes des pixels à 635 et 532 nm sans soustraction de bruit de fond) sont normalisées pour chaque puce : après exclusion des spots mal formés, une normalisation globale en fonction de l'intensité est appliquée par la procédure « lowess » afin de corriger le biais de la sonde. L'effet des blocs (différence d'impression, de lavages ou de séchages) est ensuite corrigé en soustrayant le log-ratio median calculé sur les valeurs du bloc entier aux valeurs log-ratio individuelles de chaque bloc. Finalement, le  $\log_2$  du ratio entre les deux échantillons co-hybridés sur la même puce sont également calculés pour chaque spot pour caractériser la différence d'expression ( $= \log_2$

du ratio brut auquel on applique la correction lowess et la correction bloc), ainsi qu'un logarithme normalisé de l'intensité pour chaque échantillon. Les gènes du dye-swap différentiellement exprimés ont été détectés par un test t sur les  $\log_2$ -ratios. La variance ne pouvant être calculée sur seulement deux valeurs, on suppose que la variance des  $\log_2$ -ratios est la même pour tous les spots, mais cette solution ne doit être appliquée qu'après exclusion des spots qui présente des variances spécifiques extrêmes (i.e. variance spécifique/variance commune inférieur à l' $\alpha$ -quantile d'une distribution de khi 2 à un degré de liberté ou supérieur à l' $1-\alpha$ -quantile d'une distribution de khi 2 à un degré de liberté, avec  $\alpha = 0,0001$ ). Les  $p$ -values obtenues sont corrigés par l'ajustement de Bonferroni.

### ***13.5. Exploration et analyse des résultats***

Les catégories fonctionnelles des gènes exprimés de manière différentielle sont définies en fonction des catégories définies par le MIPS comme pour l'analyse du protéome.

Afin d'analyser l'expression des gènes aux travers des différentes expériences, les valeurs des  $\log_2$  des ratios des six comparaisons ont été clustérisés avec le logiciel Genesis (Sturn *et al.* 2002 – <http://genome.tugraz.at>] selon la méthode de « clustérisation hiérarchique » en utilisant un niveau moyen de regroupement et une distance de similarité non centrée de Pearson.

## **14. Bases de données utilisées pour l'analyse des données de génomique fonctionnelle**

### ***14.1. Interaction protéine-protéine prédites in Silico***

Les prédictions concernant les interactions protéines-protéines ont été obtenues dans la base de donnée en ligne « Arabidopsis thaliana Protein Interactome Database » (AtPID, v4.0 ; <http://www.megabionet.org/atpid/webfile/>). Les méthodes de prédiction utilisées par ce site incluent la méthode de l'interactome orthologue, la méthode basée sur la co-expression, celle basée sur les domaines d'interaction, la méthode d'annotation SSBP-GO, la méthode de fusion de gènes et la méthode des profils phylogénétiques.

### ***14.2. Interactions protéine-protéine confirmées expérimentalement***

La base de donnée en ligne BioGRID<sup>3.1</sup> (<http://thebiogrid.org/>) donne les interactions protéines-protéines qui ont été confirmées expérimentalement, (par exemple par les techniques de double-hybride, de capture par affinité MS ou capture western), ainsi que la référence de la publication correspondante.



### *14.3. Co-expressions transcriptomiques*

Les co-expressions transcriptomiques sont données par le moteur de recherche OmicScan<sup>SM</sup> (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/search#result>) qui intègre dans sa recherche différentes bases de données de puces à ADN.



*Chapitre 1 : Conséquences biologiques des radiations ionisantes sur A.  
thaliana ; impacts sur le protéome et le transcriptome*

---



Au travers du fort stress oxydant qu'elles déclenchent, les radiations ionisantes affectent la majorité des voies métaboliques de la plante ce qui se répercute au niveau physiologique et morphologique (Taylor *et al.* 2009 ; De Micco *et al.* 2010 ; Esnault *et al.* 2010). Ainsi, de nombreux paramètres morphologiques, reflets des événements déclenchés au niveau moléculaire, sont affectés par les radiations ionisantes comme la taille, le poids ou la pigmentation des feuilles. L'objectif de ce chapitre est donc de caractériser la réponse aux radiations ionisantes du modèle retenu, *A. thaliana*, dans le système de culture utilisé pour l'étude. Le suivi de paramètres concernant la croissance des plantes permettra tout d'abord, d'évaluer les effets des RI sur *A. thaliana*, de déterminer le stade optimal d'étude et les doses de radiations appropriées. Ensuite, la réponse aux RI sera étudiée par deux approches de génomique fonctionnelle, une approche protéomique et une approche transcriptomique afin d'avoir une vue d'ensemble des voies métaboliques et de régulation les plus affectées par ce stress.

Dans la première étape du travail qui a donc consisté à caractériser précisément la réponse des plantules d'*A. thaliana* aux radiations ionisantes, l'écotype Col-0 a été majoritairement utilisé du fait de son statut de référence comme modèle génétique (*cf* Introduction générale – 4.). Cependant, certaines manipulations ont également été réalisées sur l'écotype *Ler*. En effet, ces deux écotypes semblaient intéressants à comparer. Outre le fait qu'ils sont utilisés comme références dans de nombreuses publications, des différences de comportement en réponse aux stress ont été mises en évidence chez ces deux écotypes. Ainsi, ils n'accumulent pas les mêmes composés antioxydants après une irradiation de 2 kGy (rayons  $\gamma$  appliqués au stade de développement 1.05), la synthèse d'anthocyanes étant privilégiée chez Col-0 au dépend de celle de l'ascorbate (Nagata *et al.* 2003).

Les doses de radiations retenues pour ce travail sont comprises entre 5 Gy et 100 Gy. Elles ont été choisies à partir des travaux préalables de l'équipe de recherche (projet Glucorad financé par la région Bretagne) et correspondent aux doses pour lesquelles un effet visible au niveau morphologique mais non létal a été observé suite à une irradiation à un stade de germinations ou de très jeunes plantules.

Les graines sont semées en boîtes de Pétri stériles (couvercle fermé) qui permettent la culture des plantes dans de bonnes conditions, c'est à dire sans signe apparent de souffrance, pendant une durée de 17 jours. Pour cela, des marqueurs simples de la santé des plantes tels que les paramètres de croissance (biomasse, longueurs des racines) ou les teneurs en pigments ont été considérés. Cette recherche de marqueurs a été menée sur des plantules ayant subi une

exposition soit au stade « émergence de l'hypocotyle et des cotylédons » (stade 0.7 selon Boyes *et al.* 2001), obtenu après 4 jours en chambre de culture dans notre protocole, soit au stade « 2 feuilles vraies ayant une longueur supérieure à 1 mm » (stade 1.02 selon Boyes *et al.* 2001), qui correspond à environ 10 jours de culture dans nos conditions. Ces deux stades ont été retenus car le stade 0.7 permet d'étudier les effets du traitement RI à long terme (10 jours) alors que le stade 1.02 permet d'analyser le comportement des plantes en présence de deux vraies feuilles (tout en optimisant la production de biomasse à court terme (3 jours)). Aussi, c'est celui qui sera utilisé pour les analyses de protéomique et de transcriptomique.

De plus, les radiations ionisantes ayant la particularité de déclencher une forte production de radicaux hydroxyles, il était intéressant d'évaluer le niveau de stress oxydant en lui-même par la mise en évidence de la production d'espèces réactives de l'oxygène. La méthode utilise des sondes à base de fluorescéine, la dichloro-dihydrofluorescéine (DCH<sub>2</sub>F) ou la carboxy-dichloro-dihydrofluorescéine (CDCH<sub>2</sub>F), qui sont stables à l'état réduit et qui peuvent être oxydées par les espèces radicales (oxydation du groupement phénolique en quinone partielle). L'oxydation est accompagnée d'un changement de valence formant une structure hautement résonnante se traduisant par une fluorescence.

Ces observations préliminaires ont permis de définir les conditions optimales pour réaliser les deux approches de génomique fonctionnelle utilisées pour l'étude globale de la réponse aux RI, l'une au niveau protéomique et l'autre niveau transcriptomique. Ainsi, l'irradiation des plantes s'est faite au stade de développement 1.02 avec des doses de 10 Gy et 40 Gy afin d'observer les changements moléculaires spécifiques d'une dose n'ayant pas d'effet phénotypique visible et d'une dose produisant un effet visible mais non-létal.

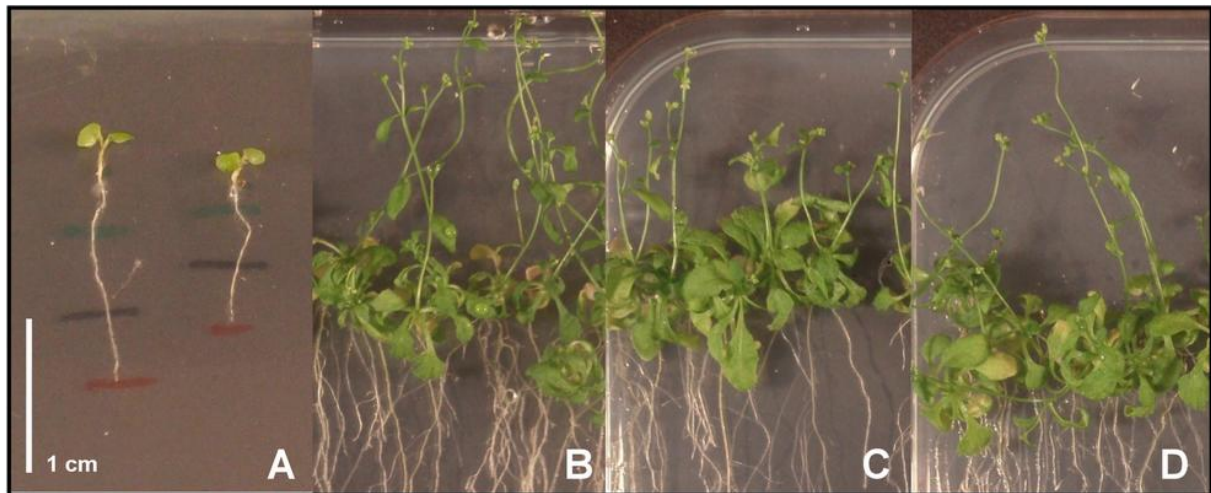
## 1. Effets des radiations ionisantes sur la santé de la plante en fonction de la dose et du stade de développement

### 1.1. Effets des radiations ionisantes sur les plantules d'*A. thaliana* au stade « émergence de l'hypocotyle et des cotylédons »

#### 1.1.1. Effets de l'irradiation sur le cycle reproductif

Les doses et conditions d'irradiation appliquées dans les expérimentations sur les végétaux varient énormément d'une publication à l'autre. C'est également le cas à l'échelle d'une espèce et en particulier de *A. thaliana*. Les stades d'irradiation sont variables (graines sèches, germinations ou plantules). Les doses sont de l'ordre du micro- au kilo- Gray soit une variation d'un facteur égal à  $10^9$ . Certaines doses paraissent élevées. Toutefois, les auteurs donnent en général peu d'informations sur le devenir des plantes après de telles irradiations, notamment sur leur survie à moyen et long terme et sur leur capacité à assurer leur cycle reproductif. C'est pourquoi la première étape du travail a porté sur ces aspects. Pour chacun des stades étudiés, les plantules irradiées en boîtes de Pétri ont donc été conservées jusqu'à 25 jours après traitement afin d'observer leur mise à fleur (trois boîtes de Pétri par dose).

Les doses 20 Gy et 40 Gy appliquées au stade 0.7 n'influent pas sur la mise à fleur des plantes. En effet, celle-ci est observée en même temps que pour les plantules non irradiées (Figure 11).



**Figure 11 – Aspect morphologique des plantules d'*A. thaliana* (Col-0) au stade de développement 0.7 (A) et vingt-cinq jours après irradiation à ce stade : 0 Gy (B), 20 Gy (C) et 40 Gy (D).**

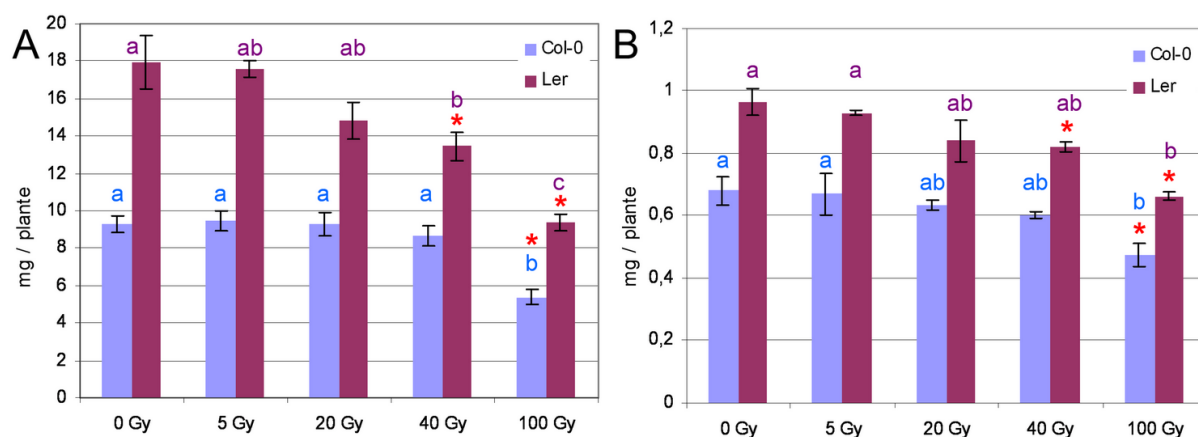
### 1.1.2. Effets de l'irradiation sur la croissance des plantes

Les masses fraîches et les masses sèches des parties aériennes des plantules, témoins de leur croissance, ont été mesurées sur les écotypes Col-0 et *Ler* dix jours après exposition à différentes doses de RI au stade de développement 0.7.

Après 14 jours de culture, l'écotype *Ler* présente un développement végétatif deux fois plus important que Col-0 au niveau des parties aériennes dont la MF est deux fois plus importante que celles de Col-0 (18 mg vs 9 mg) et des racines primaires dont la longueur est le double (35 mm vs 69 mm, Figure 12 et 13). Cette différence est en partie due à une teneur en eau des parties aériennes plus importante chez *Ler* puisque le rapport des  $MF_{Ler/Col-0}$  est de 1,55 et le rapport des  $MS_{Ler/Col-0}$  est seulement de 1,37.

L'effet des RI sur la masse des parties aériennes des plantules n'est pas identique pour les deux écotypes (Figure 12). Ils sont sans effet sur la MF et la MS des parties aériennes de Col-0 jusqu'à 40 Gy, seule la dose 100 Gy induisant une réduction de 42% de la MF et de 30% de la MS. Chez l'écotype *Ler*, les MF et MS des parties aériennes diminuent en fonction de la dose d'irradiation de manière significative à partir de 40 Gy. Les pertes sont alors de 25% pour la MF et de 15% en MS. A 100 Gy, *Ler* a perdu 48% de MF et de 31% de MS 10 jours après l'exposition aux radiations.





**Figure 12 – Masses fraîches (A) et masses sèches (B) des parties aériennes de plantules d'*A. thaliana*, écotypes Col-0 et Ler, dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. Le traitement est appliqué au stade de développement 0.7. Les lettres correspondent au classement des moyennes de Tukey après Anova significative entre les doses pour chacun des écotypes Col-0 et Ler ; \* : test t de Student significatif par rapport au contrôle non irradié (0 Gy).**

Les longueurs racinaires, mesurées quotidiennement, permettent de différencier plus finement le comportement des deux écotypes (Figure 13). L'irradiation au stade 0.7 freine la croissance des racines primaires des plantules mais avec un seuil de sensibilité différent pour les deux écotypes : *Ler* montre un retard de croissance dès 20 Gy alors qu'il faut appliquer une dose d'au moins 40 Gy pour observer un effet sur la racine primaire de Col-0. Chez Col-0, le retard de croissance provoqué par la dose 40 Gy est significatif cinq jours après traitement (j.a.t.) soit 9 jours de croissance. Il est alors de 17% et s'aggrave jusqu'à 33% dix j.a.t. L'effet de la dose 100 Gy est visible dès trois j.a.t. sur Col-0, avec une perte de longueur de la racine primaire de 21% qui atteint 68% dix j.a.t. Chez l'écotype *Ler* plus sensible, la dose 20 Gy a un effet significatif dès le troisième j.a.t., provoquant une perte de la longueur de la racine primaire de 9% qui augmente jusqu'à 14,5% 10 j.a.t. Les pertes pour les doses 40 Gy et 100 Gy sont respectivement de 20% et 36% 3 j.a.t., et de 40% et de 73% 10 j.a.t. chez cet écotype.

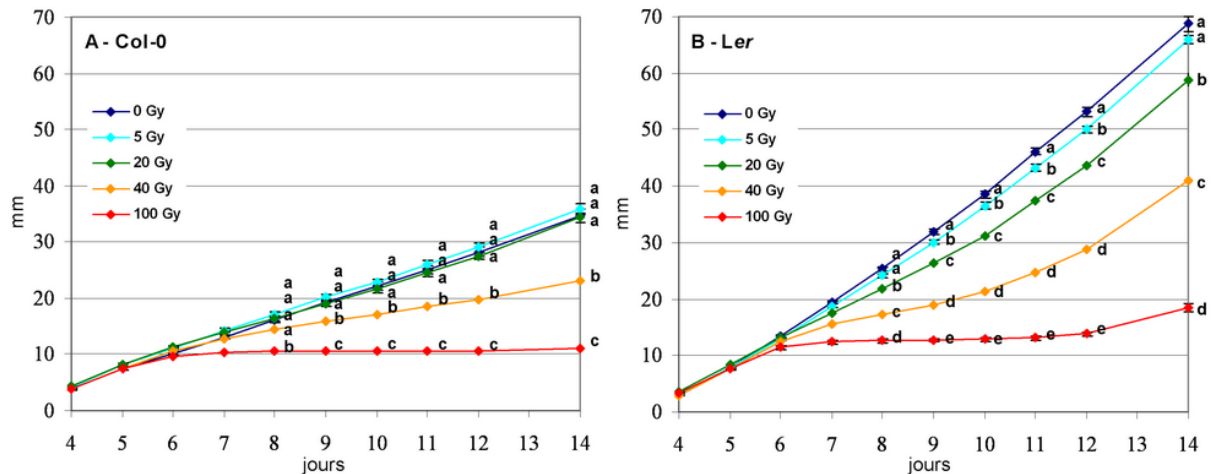


Figure 13 – Longueur en mm de la racine primaire des plantules d’*A. thaliana*, écotypes Col-0 (A) et *Ler* (B), après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. Le traitement est appliqué au stade de développement 0.7 (4<sup>ème</sup> jour de culture). Les lettres correspondent au classement des moyennes pour chaque dose de radiations ionisantes (classement paramétrique ou non paramétrique selon l’homoscédasticité ou non des données ; cf M&M – 9.).

Les retards de croissance racinaire provoqués par les RI s’accroissent pour toutes les doses jusqu’à 5 j.a.t. C’est aussi à cette même date que l’on observe les accroissements journaliers les plus faibles. Ainsi, pour Col-0, à la dose de 40 Gy la croissance est de 1,2 mm / jour contre 2,8 mm / jour pour les plantes contrôles (-57%), et les plantes exposées à 100 Gy ont quasiment stoppé leur croissance (0,01 mm / jour). Pour *Ler*, elle est de 0,64 mm / jour après 40 Gy contre 1,1 mm pour les plantes contrôles (-42%) et 0,1 mm / jour après 100 Gy. Après cette date, il y a une reprise progressive de la croissance journalière pour toutes les doses, à l’exception de la dose 100 Gy qui affecte les racines de façon plus drastique. En fin d’expérience, les plantes Col-0 ont recouvré un accroissement journalier équivalent à 50% de celui des plantes contrôles (1,6 mm / jour vs 3,2 mm / jour) et les plantes *Ler* un accroissement de 86% comparé aux plantes contrôles non irradiées (1,4 mm / jour vs 1,65 mm / jour).

### 1.1.3. Effets de l’irradiation sur les teneurs en pigments photosynthétiques

Les teneurs en pigments mesurées dix jours après traitement varient peu suite aux irradiations de 5 Gy et 20 Gy (Figure 14). La dose 40 Gy provoque une augmentation des teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes chez Col-0 (28% et 21% respectivement). Par contre, la dose 100 Gy provoque une diminution des teneurs en chlorophylles et caroténoïdes chez les deux écotypes étudiés (Col-0 : -28% et -37% ; *Ler* : -12% et -21%).

Il n’y a pas d’effet notable des radiations sur les ratios chlorophylle a / chlorophylle b qui restent remarquablement constants quelque soit la dose d’irradiation appliquée. On note par

contre que les rapports chlorophylles / caroténoïdes augmentent dix jours après irradiation pour la dose 100 Gy chez les deux écotypes.

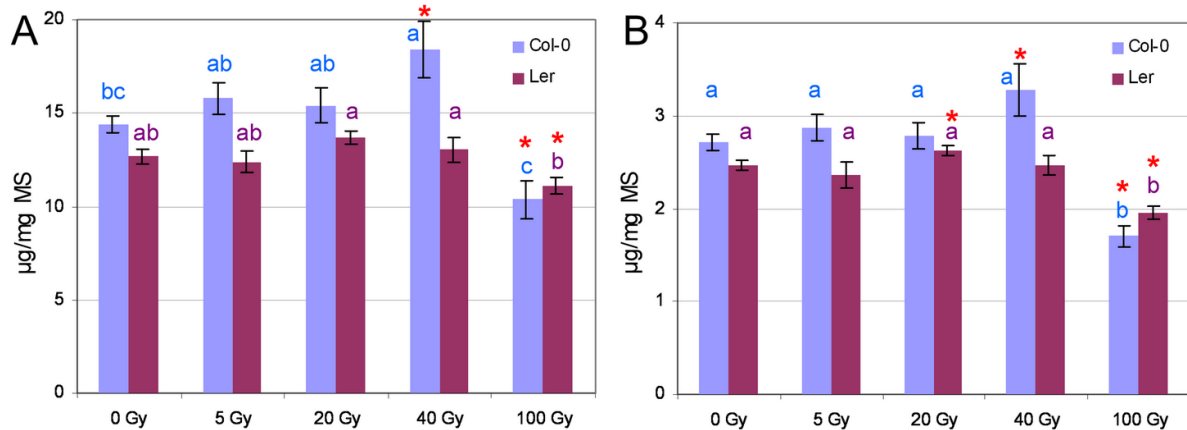


Figure 14 – Teneurs en chlorophylles totales (A) et en caroténoïdes (B) chez *A. thaliana*, écotypes Col-0 et Ler dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. Le traitement est appliqué au stade de développement 0.7. Les lettres correspondent au classement des moyennes de Tukey après Anova significative entre les doses pour chacun des écotypes Col-0 et Ler ; \* : test t de Student significatif par rapport au contrôle non irradié (0 Gy).

### 1.2. Effets des radiations ionisantes sur les plantules d'*A. thaliana* au stade « 2 feuilles vraies »

L'analyse de l'effet des radiations ionisantes a été menée également à un stade plus tardif (1.02) afin d'étudier le comportement de plantes ayant développé deux vraies feuilles. Ce stade sera par la suite utilisé pour les approches de génomique fonctionnelle.

Deux doses de radiation ont été retenues en fonction des effets observés précédemment. La dose 40 Gy a été conservée car elle provoque systématiquement un retard de croissance significatif des racines quelque soit l'écotype étudié. Une plus faible dose de 10 Gy a également été retenue. D'après les résultats précédents, elle ne provoque pas d'effets visibles sur le développement des plantes mais pourrait révéler une réponse moléculaire différente.

#### 1.2.1. Effets de l'irradiation sur le cycle reproductif

L'application des traitements 10 Gy et 40 Gy au stade 1.02 n'empêche pas la floraison. En effet, celle-ci est observée vingt-cinq jours après irradiation, en même temps que celle de plantes non irradiées (Figure 15).

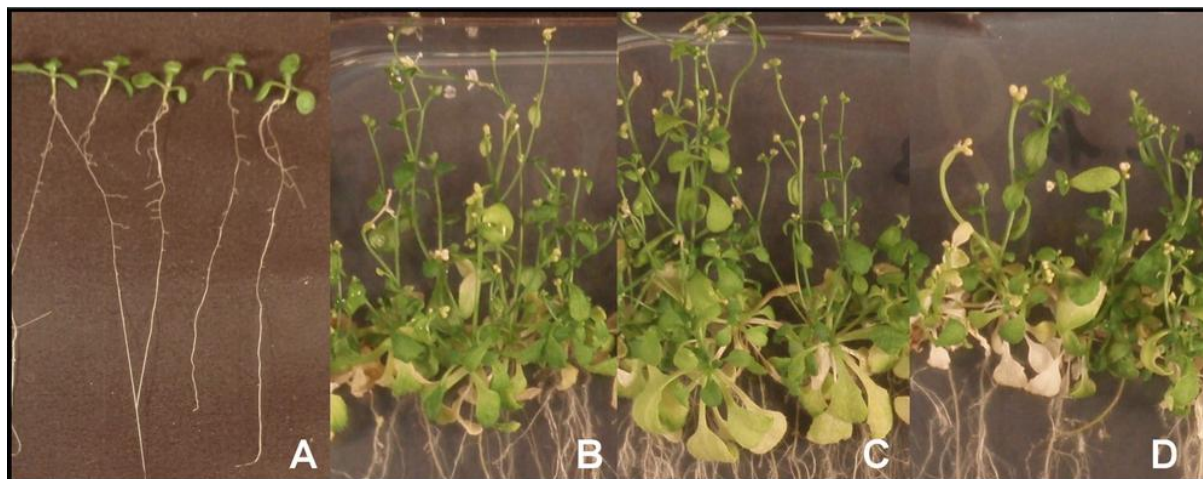


Figure 15 – Aspect morphologique des plantules d'*A. thaliana* (Col-0) au stade de développement 1.02 (A) et vingt-cinq jours après irradiation à ce stade : 0 Gy (B), 10 Gy (C) et 40 Gy (D).

Pour chacun de ces traitements, les plantes irradiées ont été capables de compléter leur cycle de reproduction et de produire des graines viables.

#### 1.2.2. Effets de l'irradiation sur la croissance des plantes

Les plantes ont été récoltées et analysées jusqu'au dix-septième jour de culture, soit sept jours après irradiation, le système de culture en boîtes de Pétri ne permettant pas de les cultiver plus longtemps dans de bonnes conditions. Les parties aériennes et les racines des plantes ont été séparées pour mieux appréhender l'effet des radiations sur la biomasse de l'une ou l'autre des parties.

Comme précédemment, les paramètres de croissance montrent un développement végétatif des plantules plus important chez l'écotype *Ler* que chez Col-0, que lon se réfère aux MF des parties aériennes (23,4 mg vs 11,1 mg / plante) ou aux MF et longueurs racinaires (5,2 mg / plante et 69,3 mm vs 3,8 mg / plante et 61,2 mm ; valeurs données à dix-sept jours de culture pour les plantes non-irradiées). Aucune des deux doses d'irradiation appliquées au stade 1.02 n'induit de différence significative des masses fraîches à dix-sept jours de culture (Figure 16).

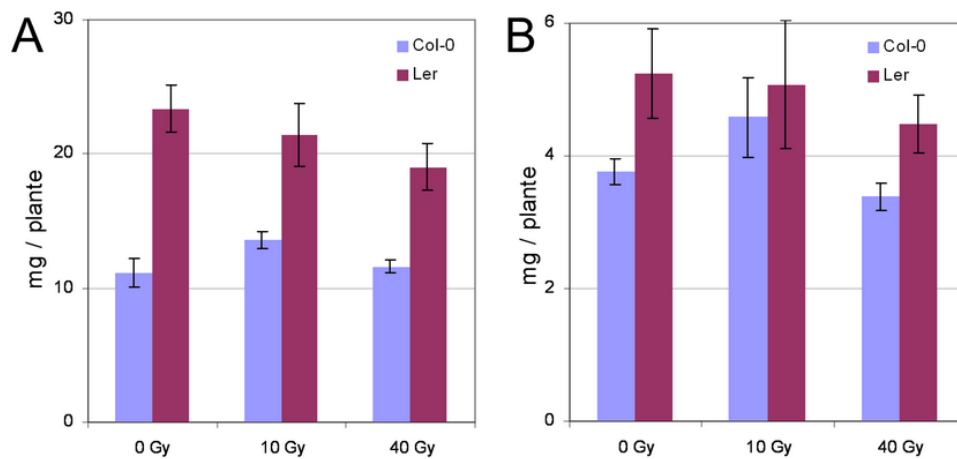


Figure 16 – Masses fraîches des parties aériennes (A) et des racines (B) de plantules d'*A. thaliana*, écotypes Col-0 et Ler, sept jours après exposition à des doses de radiations ionisantes de 10 Gy et 40 Gy. Le traitement est appliqué au stade de développement 1.02. Aucune différence statistiquement significative.

Le suivi des longueurs racinaires confirme la différence de comportement entre les deux écotypes. La dose 40 Gy provoque une diminution de la croissance racinaire dès 2 j.a.t. chez Col-0 et à 3 j.a.t. chez *Ler* (Figure 17). La dose 10 Gy induit un effet stimulant, non significatif pour l'écotype *Ler* et significatif pour Col-0. Sept jours après traitement, les racines ont récupéré une longueur racinaire et un accroissement journalier identiques à ceux des témoins, l'effet positif préalablement observé ayant alors disparu. A 7 j.a.t. et 40 Gy, la racine primaire est 20% plus courte que celle des plantules témoins.

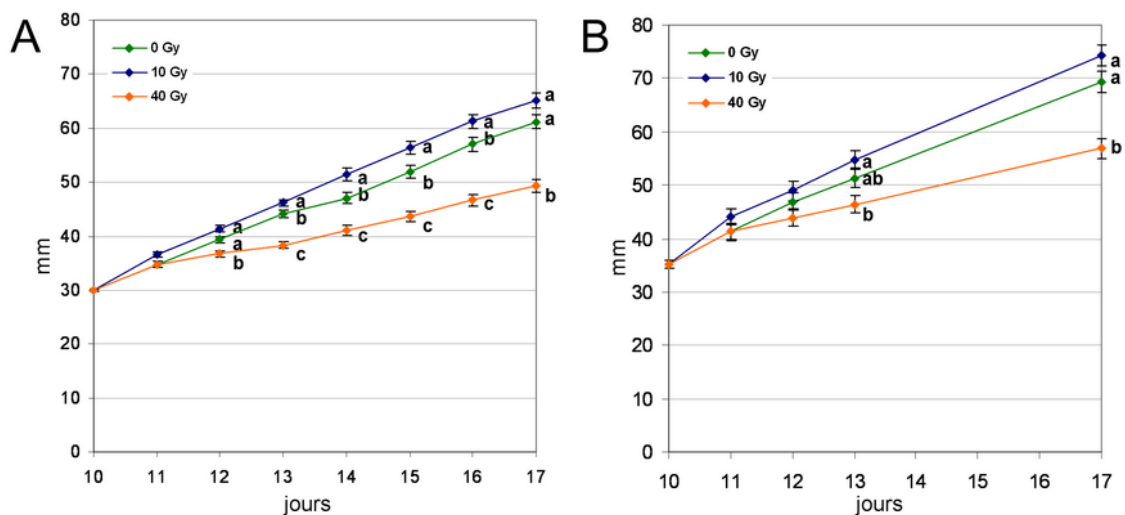


Figure 17 – Longueur en mm de la racine primaire des plantules d'*A. thaliana*, chez les écotypes Col-0 (A) et Ler (B), après exposition à des doses de radiations ionisantes de 10 Gy et 40 Gy. Le traitement est appliqué au stade de

développement 1.02. Les lettres correspondent au classement des moyennes par test de Tukey après Anova significative entre les différentes doses de radiations ionisantes pour chaque date.

### 1.2.3. Effets de l'irradiation sur les teneurs en pigments photosynthétiques

Seule la dose 40 Gy a provoqué un effet significatif sur les teneurs en pigments sept jours après irradiation, et ce seulement chez l'écotype *Ler* (Figure 18). Sa teneur en chlorophylles a diminué de 30% et sa teneur en caroténoïdes de 28%.

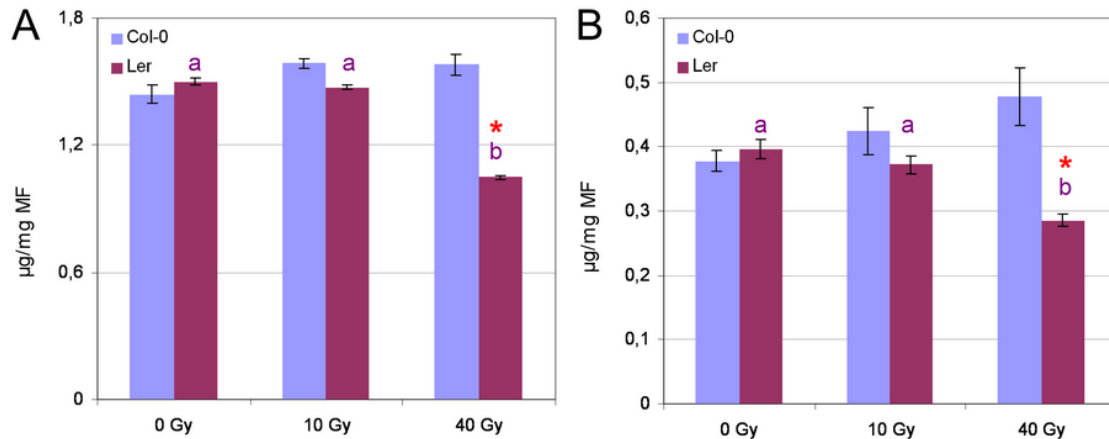
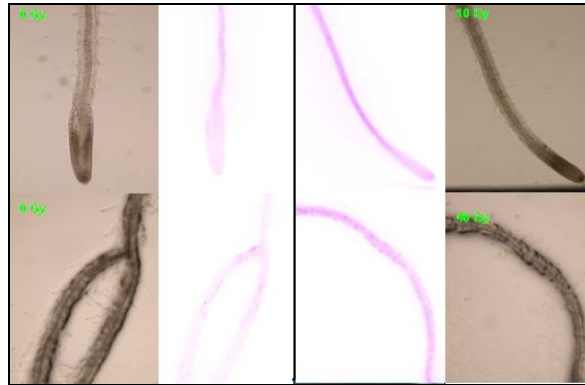


Figure 18 – Teneurs en chlorophylles totales (A) et en caroténoïdes (B) chez *A. thaliana*, écotypes Col-0 et *Ler*, sept jours après exposition à des doses de radiations ionisantes de 10 Gy et 40 Gy. Le traitement est appliqué au stade de développement 1.02. Les lettres correspondent au classement des moyennes de Tukey après Anova significative entre les doses pour l'écotype *Ler* (Anova non significative pour Col-0) ; \* : test t de Student significatif par rapport au contrôle non irradié (0 Gy).

### 1.3. Détection de la production de ROS dans les racines suite à l'irradiation

La production d'espèces réactives de l'oxygène dans les organismes peut être mise en évidence par des sondes fluorescentes. Les deux sondes utilisées dans les expériences suivantes sont la dichloro-dihydrofluorescéine (DCH<sub>2</sub>F) et la carboxy-dichloro-dihydrofluorescéine (CDCH<sub>2</sub>F). Leur spécificité vis à vis des espèces réactives de l'oxygène n'est pas clairement établie mais elles sont utilisées pour détecter le « stress oxydant » dans de nombreux travaux (Wardman 2007). Elles pénètrent dans le compartiment cellulaire sous forme diacétate où elles sont converties en DCH<sub>2</sub>F ou CDCH<sub>2</sub>F, imperméables à la membrane plasmique, par les estérases cytoplasmiques. Retenues dans la cellule, elles peuvent alors être oxydées par les ROS présents. Le groupement carboxyle de la sonde CDCH<sub>2</sub>F augmente sa rétention dans la cellule. Le but de ces expériences est de mettre en évidence la production des ROS en microscopie et de quantifier leur production sur photographies en fonction de la dose d'irradiation.

La détection des ROS par microscopie a été réalisée sur des cultures racinaires. Celles-ci proviennent de cultures cellulaires, provenant elles même de cals dispersés dans les milieux de culture liquides. Cette méthode s'est finalement avérée la meilleure pour obtenir des cultures de bonne qualité et viables dans le temps. La sonde utilisée est la DCH<sub>2</sub>F et les racines ont été irradiées à 10 ou 40 Gy (Figure 19).



**Figure 19 – Photographies dans le visible et en fluorescence (photo présentée en négatif pour un meilleur contraste) de racines infiltrées avec la sonde DCH<sub>2</sub>F-DA et irradiées à 10 Gy ou 40 Gy (grossissement x1000). En face de chaque photo est montrée une photo du contrôle non irradié correspondant.**

Globalement, l'intensité de l'oxydation de la sonde augmente suite au traitement par les deux doses d'irradiation. Une faible fluorescence correspondant au « bruit de fond » est visible dans les racines témoins (0 Gy). Elle reste, toutefois, très en deçà de la fluorescence observée après irradiation. Par ailleurs, les échantillons irradiés à 40 Gy montrent souvent des halos de fluorescence qui correspondent à une sortie de la sonde des tissus due aux temps d'irradiation assez longs. En effet une irradiation de 40 Gy correspond à un temps d'environ 23 min dans l'irradiateur compte tenu d'un débit de dose de 1,7 Gy.min<sup>-1</sup> au niveau des plantes. On peut donc penser qu'il y a une perte d'une partie de la sonde oxydée, très labile, et que la fluorescence observée est sous-estimée.

#### **1.4. Discussion**

Parmi les marqueurs étudiés, la croissance racinaire apparaît comme le meilleur indicateur morphologique des effets de l'irradiation sur les plantules (Figure 20 ; Tableau 6). En effet, les biomasses, fraîches ou sèches, montrent peu de variations significatives pour les faibles doses. Elles ne sont affectées que par les doses les plus fortes de nos expériences, à savoir la dose 100 Gy qui agit dans les mêmes proportions chez les deux écotypes de référence, et la dose 40 Gy qui, appliquée au stade 0.7, provoque également une diminution des biomasses chez l'écotype *Ler*. De la même manière, les teneurs en pigments photosynthétiques ne varient que pour ces deux doses (une seule exception pour la teneur en caroténoïdes après 20

Gy chez *Ler*). Le suivi de la croissance racinaire permet par contre de détecter une réaction des plantes dès 5 Gy ou 10 Gy selon le stade du traitement ou l'écotype étudié. Cette hypersensibilité des racines aux radiations ionisantes, qui a été mise en évidence dans d'autres travaux (Vandenhove *et al.* 2010), fait de la croissance racinaire un marqueur très pertinent.

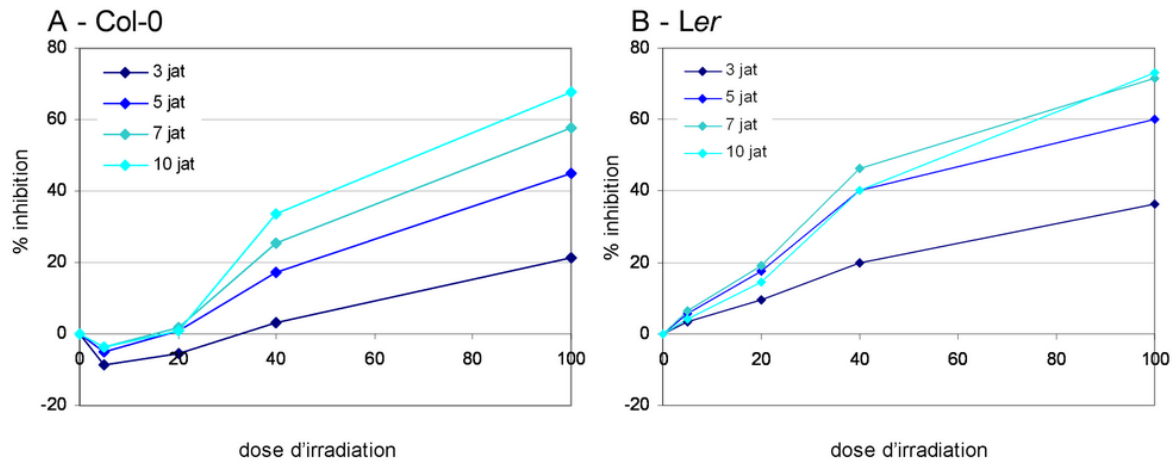


Figure 20 – Inhibition de la croissance racinaire d'*A. thaliana* après exposition à différentes doses de radiations ionisantes appliquées au stade de développement 0.7, exprimée en % par rapport aux plantes contrôles non irradiées (3, 5, 7 et 10 jour après traitement). En rouge : équations des régressions linéaires réalisées entre 5 Gy et 40 Gy chez Col-0 et entre 0 Gy et 40 Gy chez Ler.

Tableau 6 – Résultats majeurs reflétant les effets des RI sur la croissance de Col-0 et Ler exprimés en pourcentage de perte de masse ou de longueur racinaire (d'après les données présentées dans les figures 12 à 14 et 16 à 18). PA = partie aérienne. ND = données non déterminées. Statistiques : NS = non significatif ; surligné en jaune = significative par comparaison multiple par anova ou Kruskal-Wallis ; \* = significative par test t de Student.

Stade d'irradiation	MF	MS	Longueur racinaire	Longueur racinaire	Longueur racinaire	Chlorophylles	Caroténoïdes	Chloro/Carot	Floraison
<b>Col-0</b>									
<b>0.7</b>	<b>10 j.a.t.</b>	<b>10 j.a.t.</b>	<b>3 j.a.t.</b>	<b>5 j.a.t.</b>	<b>10 j.a.t.</b>	<b>10 j.a.t.</b>	<b>10 j.a.t.</b>	<b>10 j.a.t.</b>	<b>25 j.a.t.</b>
5 Gy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	ND
20 Gy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	oui
40 Gy	NS	NS	NS	-17%	-33%	+28% *	+21% *	NS	oui
100 Gy	-42% *	-30% *	-21%	-45%	-68%	-28% *	-37% *	+14%	ND
<b>1.02</b>	<b>7 j.a.t.</b>		<b>3 j.a.t.</b>	<b>5 j.a.t.</b>	<b>7 j.a.t.</b>	<b>7 j.a.t.</b>	<b>7 j.a.t.</b>		<b>25 j.a.t.</b>
10 Gy	NS	ND	+5% *	+9% *	+9% *	NS	NS	NS	oui
40 Gy	NS	ND	-13% *	-16% *	-19% *	NS	NS	-13% *	oui
<b>Ler</b>									
<b>0.7</b>	<b>10 j.a.t.</b>	<b>10 j.a.t.</b>	<b>3 j.a.t.</b>	<b>5 j.a.t.</b>	<b>10 j.a.t.</b>	<b>10 j.a.t.</b>	<b>10 j.a.t.</b>	<b>10 j.a.t.</b>	
5 Gy	NS	NS	NS	-6%	NS	NS	NS	NS	ND
20 Gy	NS	NS	-9%	-17%	-14%	NS	+6% *	NS	ND
40 Gy	-25% *	-15% *	-20%	-40%	-40%	NS	NS	NS	ND
100 Gy	-48% *	-31% *	-36%	-60%	-73%	-12% *	-21% *	+11% *	ND
<b>1.02</b>	<b>7 j.a.t.</b>		<b>3 j.a.t.</b>	<b>5 j.a.t.</b>	<b>7 j.a.t.</b>	<b>7 j.a.t.</b>	<b>7 j.a.t.</b>		
10 Gy	NS	ND	NS	ND	NS	NS	NS	NS	ND
40 Gy	NS	ND	-10% *	ND	-18% *	-30%	-28%	NS	ND



Plusieurs travaux menés sur Col-0 et *Ler* ont montré des réponses différentes face aux stress qui s'expliquent par la grande variabilité génétique existante entre eux (Cork *et al.* 2005). Pour les radiations ionisantes, *Ler* semble plus sensible aux faibles doses que Col-0 lorsqu'elles sont appliquées au stade 0.7 (diminution des biomasses des parties aériennes dès 40 Gy et inhibition de la croissance racinaire dès 20 Gy ; Tableau 6). Toutefois, il récupère une croissance racinaire normale plus rapidement que Col-0 après une exposition de 40 Gy. Il a été rapporté que *Ler* synthétisait principalement de l'acide ascorbique en réponse à une irradiation aiguë de 2 kGy (Nagata *et al.* 2005) alors que l'écotype Col-0 favorisait plutôt la production d'anthocyanes. La récupération plus rapide de *Ler* pourrait ainsi être liée à la meilleure efficacité antioxydante de l'acide ascorbique contre les ROS générés suite aux faibles doses d'irradiation. La légère augmentation des teneurs en pigments chez Col-0 après la dose 40 Gy appliquée au stade 0.7 demande à être confirmée expérimentalement (caroténoïdes significatifs d'après un seul test), mais pourrait également constituer une voie de défense antioxydante non détectée chez *Ler*.

D'autre part, des différences ont également été mises en évidence dans la voie de signalisation de l'héxénal (ou voie des GLV, pour « green leaf volatiles ») qui contrôle l'activation de certaines défenses de la plante. Chez Col-0, cette voie est inexistante du fait d'une hydroperoxydase non fonctionnelle (délétion de 10 nucléotides au niveau du gène). Cette mutation naturelle a des conséquences sur la régulation de certaines voies du métabolisme secondaire, notamment par exemple sur la voie des GLSs. En effet, une analyse Col-0 versus *Ler* par puce à ADN a montré la sous expression chez Col-0 des gènes CYP83A1, CYP79F1, AOP3 de la voie des GLS aliphatiques qui pourrait découler de l'absence de la voie hexénal et qui semble être compensée par une sur expression du gène CYP83B1 de la voie des GLS indoliques (Duan *et al.* 2005).

La variabilité entre les deux écotypes ne concerne pas seulement le métabolisme. En effet, à l'origine, la lignée *Ler* (*Landsberg erecta*) est un mutant homozygote récessif qui a été sélectionné pour sa petite taille par le professeur George P. Redei, dans une population de graines Landsberg sur lesquelles il a mené des expériences de mutagenèse par rayon-X. (information sur les écotypes fréquemment utilisés : site du NASC, <http://arabidopsis.info/CollectionInfo?id=94>). Il porte une mutation dans le gène *ERECTA* codant pour un récepteur-like-kinase impliqué dans le développement de la plante (Torii *et al.* 1996). Ce gène régule notamment l'architecture florale en agissant sur l'élongation des internœuds et des pétioles ainsi que la forme des organes latéraux (Woodward *et al.* 2005), mais il intervient également dans la réponse à certaines maladies cryptogamiques (Llorente *et al.*

2005) ou dans la régulation de la transpiration (Masle *et al.* 2005). Cette mutation peut donc être un élément intervenant dans l'inhibition de la croissance racinaire accrue chez *Ler* après la dose 20 Gy.

La dose 40 Gy semble avoir le même impact sur Col-0 lorsqu'elle est appliquée au stade 0.7 ou 1.02. En effet, elle conduit dans les deux cas à un effet nul sur les biomasses aériennes et à une inhibition de la croissance racinaire de 17% ou 16% respectivement à 5 j.a.t. Par contre, chez *Ler*, l'effet de cette dose sur les racines est moindre si l'irradiation est appliquée au stade plus tardif. Enfin, la dose 10 Gy, qui n'a été testée qu'au stade 1.02, semble avoir un effet stimulateur de la croissance racinaire chez Col-0 (+ 9% à 5 et 7 j.a.t.). Cet effet stimulant ou hormesis, observé de manière récurrente sur différents modèles est toujours lié à de faibles doses de radiation de 1 à 5 Gy pour les végétaux, par exemple pour *C. annuum* (Kwon *et al.* 2001 ; Kim *et al.* 2005a). Il fait l'objet de débats contradictoires (Calabrese 2005).

Pour l'approche de génomique fonctionnelle, seul l'écotype Col-0, dont le génome séquencé a servi de référence pour le développement des bases de données, a été retenu. Il permet désormais de disposer d'un nombre important d'outils d'analyses génétiques. Le stade d'irradiation 1.02 a été retenu afin d'étudier la réponse des plantules possédant deux feuilles vraies à court et moyen terme (2, 24 et 72 h après traitement). En fonction de la réponse morphologique observée précédemment, les doses de 10 Gy et 40 Gy ont été retenues. Au stade de développement 1.02, la dose 100 Gy provoque un arrêt de croissance durable des plantes et un effondrement important de tous les marqueurs étudiés. Par contre, la dose 40 Gy provoque une diminution nettement observable de la croissance racinaire, sans que celle-ci ne soit cependant trop dommageable pour les plantes puisqu'elles semblent récupérer rapidement un développement normal. La dose 10 Gy quant à elle semble provoquer un stress oxydant plus fugace. Elle ne freine pas le développement des parties aériennes et semble plutôt stimuler la croissance racinaire chez Col-0. Ces deux doses pouvaient donc déclencher la réaction de voies de signalisation cellulaires en partie différentes et c'est pourquoi elles ont été retenues pour l'étude de génomique fonctionnelle. Les racines ont été mesurées systématiquement sur photos en parallèle de toutes les expériences à suivre afin de vérifier la répétabilité du niveau de réponse morphologique.

## 2. Effets des radiations ionisantes sur le protéome d'*A. thaliana*

### 2.1. Introduction

L'étude physiologique de la réponse d'*A. thaliana* aux radiations ionisantes a permis de définir le cadre d'étude optimal pour l'exploration moléculaire à suivre. L'effet d'une irradiation aiguë de 10 Gy ou 40 Gy appliquée au stade de développement 1.02 a tout d'abord été analysé par ses effets sur le protéome. Les gels d'électrophorèse bi-dimensionnelle (2D-E) et l'analyse comparative des profils protéiques ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du professeur Jesús V. Jorrín-Novo et au sein de son laboratoire (Agricultural & Plant Biochemistry, Université de Cordoue, Espagne). L'identification des protéines a été réalisée à la plateforme protéomique UCO-SCAI de l'Université de Cordoue (Espagne). Jusqu'à présent, seules deux études ont traité de la réponse du protéome des plantes après irradiation. Toutefois, elles étaient axées sur les protéines de réserve des graines de soja et de lin récoltées après culture de ces deux espèces dans des zones contaminées suite à l'accident nucléaire de Chernobyl (Danchenko *et al.* 2009 ; Klubicová *et al.* 2010). L'article « Application of proteomics to the assessment of the response to ionising radiation in *Arabidopsis thaliana* »<sup>3</sup> publié dans « Journal of proteomics » et présenté à suivre, rassemble les résultats majeurs issus de cette partie de la thèse.

### 2.2. Résumé

L'analyse du protéome d'*A. thaliana* a été effectuée en réponse aux doses de RI sub-létales 10 Gy et 40 Gy, appliquées sur les plantes au stade de développement 1.02. Pour cette analyse comparative, les protéines solubles des plantes ayant été exposées à l'une ou l'autre dose de RI, ainsi que celles de plantes n'ayant subi aucun traitement (contrôle 0 Gy), ont été extraites et soumises à une 2D-E. Les parties aériennes et les racines d'*A. thaliana* ont été traitées séparément. De plus, pour chaque dose, l'évolution de la réponse a été observée à différents temps 2h, 24h et 72h après irradiation. Les changements entre les profils des gels ont ensuite pu être analysés à l'aide d'un logiciel de traitement d'images spécialisé.

L'analyse statistique a révélé un total de 172 protéines différentiellement exprimées par rapport au contrôle, 145 dans les parties aériennes et 27 dans les racines, en fonction de la dose et de la cinétique. Ces protéines ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF et la confrontation des données résultantes avec les banques de données

---

<sup>3</sup> Gicquel M, Esnault MA, Jorrín-Novo JV, Cabello-Hurtado F. J Proteomics 2011;74(8):1364-1377.

protéomique a abouti à l'identification de 144 protéines avec succès (118 dans les parties aériennes et 26 dans les racines).

Dans un premier temps, les profils globaux en protéines ont révélé des réponses très différentes du protéome des parties aériennes face aux deux doses étudiées. La dose 10 Gy provoque un nombre de surexpressions relativement stable dans le temps (11, 7 et 10 à 2, 24 et 72 h respectivement) et un nombre de répressions qui augmente entre 2 h et 72 h (5, 11, 13). La dose 40 Gy induit numériquement quatre fois plus de régulations que la dose 10 Gy à 2 h, 1,8 fois plus à 24 h et 1,6 fois plus à 72 h. De plus, ces régulations présentent des amplitudes plus importantes. Le nombre de sur-expressions après 40 Gy augmente légèrement sur le temps de la cinétique (de 16 à 22) alors que le nombre de sous-expressions, très important à 2 h (48), diminue avec le temps (17 et 16 à 24 et 72 h respectivement). Il y a peu de recouvrement entre les spots induits à 10 Gy et à 40 Gy. Par contre, 10% des spots sous-exprimés à 24 h et 39% des spots sous-exprimés à 72 h le sont pour 10 Gy et 40 Gy. Au niveau des profils racinaires, les échantillons des 3 points cinétiques ont dû être regroupés pour avoir assez de matériel. La dose 10 Gy provoque une augmentation de l'intensité de huit spots et une diminution de celle de neuf spots alors que la dose 40 Gy induit la sur-expression de cinq spots contre seize sous-expressions.

Dans un second temps, l'identification des protéines a permis de dégager des groupes fonctionnels impliqués dans la réponse à court et moyen terme en fonction de la dose du traitement.

La dose 10 Gy provoque la sur-expression de protéines thylakoïdales (PsbP protein (PSII), Clp ATP synthase CF1 ( $\gamma$  subunit)) et d'enzymes du cycle de Calvin (fructose bi-phosphate aldolase 2, rubisco activase et GA3PDH-B) ce qui suggère une stimulation de la photosynthèse. D'autre part, la dose 10 Gy semble également induire l'hydrolyse active de métabolites secondaires particuliers, les glucosinolates. En effet, parmi les protéines régulées par cette dose, on trouve cinq composants du complexe PYK10 qui présente une activité myrosinase ( $\beta$ -Glucosidase PYK10 3D precursor, PYK10 binding protein JAL30/PBP1, Myrosinase binding protein JAL35/JR1, Myrosinase-associated protein GLL22 and Epithiospecifier modifier GLL65/ESM1).

Contrairement à l'effet observé à 10 Gy, une dose de 40 Gy provoque la diminution de cinq spots correspondant à des protéines chloroplastiques, constitutives de l'antenne collectrice (CAB2A protein, PSI protein LHCA3), des ATPases stromales (Clp ATP synthase

CF1,  $\gamma$  et  $\alpha$  subunit) ou impliquées dans le transport photosynthétique d'électrons (Cytochrome f apoprotein). Par ailleurs, la dose 40 Gy stimule la production d'enzymes de détoxification des ROS (Annexin ANNAT1, Peroxisomal catalase 2 and Monodehydroascorbate reductase 2). Elle agit également sur l'expression d'un certain nombre d'enzymes impliquées dans la photorespiration (diminution des deux isoformes peroxisomales GGAT1 et GGAT2 de la glutamate:glyoxylate aminotransferase ; augmentation rapide du niveau de l'aminomethyltransferase glycine decarboxylase T subunit et de la serine hydroxymethyltransferase SHM1 dans la mitochondrie ; au niveau du chloroplaste, réduction de la biosynthèse de glutathion (diminution des spots GSH1 and GSH2) au profil de la synthèse de glutamine signalée par une augmentation forte de l'expression de la glutamine synthétase GS2). Enfin la dose 40 Gy réduit le niveau d'expression de trois enzymes relatives à l'utilisation de l'aspartate (aspartate transaminase, asparagine synthase and aspartate-semialdehyde dehydrogenase).

Finalement, cette étude a mis en évidence la régulation de certaines sous-unités du complexe protéolytique chloroplastique ClpPRS après les deux doses d'irradiation. Ce complexe étant impliqué dans le turn-over des protéines chloroplastiques, il pourrait participer à la régulation de la photosynthèse de manière post-traductionnelle. De plus, certains éléments potentiels de la voie de signalisation de la réponse développementale aux radiations ont été mis en avant. En effet, l'acclimatation des plantes au stress environnemental implique souvent des mécanismes de transduction par des kinases, or les résultats montrent une régulation différentielle des récepteurs de C-kinases de la famille RACK1. Ils interagissent avec de nombreuses protéines de signalisation et leur rôle central a été démontré dans la régulation du développement face à divers stress chez *A. thaliana*. RACK1A est surexprimé après les deux doses dans les parties aériennes alors qu'il est réprimé dans les racines après 40 Gy et pourrait donc être impliquée dans l'inhibition de la croissance racinaire observée à cette dose. D'autre part, une baisse d'expression de RACK1B et RACK1C est observée après la dose 10 Gy. De même, la protéine emb1796 protein, qui est la plus sous-exprimée dans les racines après 40 Gy, pourrait également être impliquée dans la réponse racinaire car elle interagit avec la protéine kinase cyclin-dependent CDKA;1 qui régit le cycle cellulaire (Van Leene *et al.* 2010 ; synonyme = Cdc2 dans l'article *cf* Chapitre 1 – 2.3.).

### **2.3. Article : « Application of proteomics to the assessment of the response to ionising radiation in *Arabidopsis thaliana* »**



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)

# Application of proteomics to the assessment of the response to ionising radiation in *Arabidopsis thaliana*

Morgane Gicquel<sup>a</sup>, Marie-Andrée Esnault<sup>a</sup>, Jesús V. Jorrín-Novo<sup>b</sup>, Francisco Cabello-Hurtado<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Mechanisms and Origin of Biodiversity Team, UMR 6553-Ecobio, University of Rennes1, 263 Av. du Général Leclerc, Campus de Beaulieu-Bât.14A, 35042 Rennes, France

<sup>b</sup> Agricultural & Plant Biochemistry, Proteomics Research Group, University of Córdoba, Campus de Rabanales, Ed. Severo Ochoa, 14071 Córdoba, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 14 December 2010

Accepted 21 March 2011

Available online 5 April 2011

### Keywords:

Ionising radiation

Oxidative stress

*Arabidopsis* leaf and root proteome

Two-dimensional electrophoresis

MALDI-TOF/TOF mass spectrometry

## ABSTRACT

Ionising radiation (IR) affects cellular and tissue function. However, the biological effects and interactions induced by IR are unclear. The aim of this study was to decipher the proteomic patterns that influence these pathways. The proteomes of *Arabidopsis thaliana* roots and rosettes were analysed in response to sub-lethal IR doses (0, 10, and 40 Gy). For each dose, the dynamic response was observed at different time points (2, 24 and 72 h). To quantitatively measure the effect of IR on the proteome, total proteins were extracted and subjected to 2-DE, and the changes in the 2-DE protein profiles were analysed. Statistical analysis revealed a total of 172 proteins (145 in leaves and 27 in roots) that were differentially expressed. These proteins were subsequently analysed by MALDI-TOF/TOF MS and comparative database analysis, and 144 (118 in leaves and 26 in roots) proteins were identified. The changes in the protein profile were quantitatively more significant for the 40 Gy dose than for the 10 Gy dose. In addition, specific functional groups of proteins were identified based on the consistency of the dose- and time-responses. The molecular mechanisms involved in the response to IR and a comparison of the observed responses are discussed.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Ionising radiation (IR) consists of high energy electromagnetic waves liberated during radioactive phenomena. X-rays, a type of ionising radiation, easily penetrate living tissues and induce excitations and ionisations along their path that cause harmful biological damage. This damage is mainly due to the generation of reactive oxygen species (ROS) in cells from water radiolysis, particularly hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ), which can initiate the subsequent generation of secondary reactive species such as  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}_2$  and organic peroxides by chain reactions. ROS can severely damage DNA, proteins and lipids. Furthermore, the unpaired electrons that are generated by the interaction of IR with many biological molecules create an

unstable energetic state in those molecules that is conserved for several days, and ROS are produced continuously from those chemical reactions [1].

In nature, plants are exposed to low cosmic and telluric radiances and can also be subjected to anthropogenic radiation due to industrial activities or following an accidental contamination. Radiosensitivity differs by species [2]; for example, *A. thaliana* can complete its sexual cycle after a 100 Gy irradiation (unpublished results), while a 40 Gy dose is fatal to *Pisum sativum* [3]. Additionally, the developmental stage of the plant at the time of irradiation plays an important role in radioresistance [4,5]; fluctuations in water content that occur during the life of the plant are particularly important. An understanding of the plant response to ionising radiation would facilitate the

\* Corresponding author. Tel.: +33 223235022; fax: +33 223235026.

E-mail address: [francisco.cabello@univ-rennes1.fr](mailto:francisco.cabello@univ-rennes1.fr) (F. Cabello-Hurtado).

improvement of plant growth under environmental stresses because all of these types of stress are characterised by oxidative stress, which is the main disturbing element in IR exposure.

In plants, several metabolic pathways can be affected by IR, reflecting the balance between a variety of intracellular signalling pathways [6]. Some of these pathways are related to cell death, while others are associated with enhanced survival. One of the main responses is the induction of ROS defences, which include antioxidative compounds such as anthocyanins and vitamin C [7,8] as well as antioxidative enzymatic activities such as peroxidase, ascorbate peroxidase, catalase or superoxide dismutase [2,6]. IR exposure also leads to morphological changes due to processes that are related to the ROS signal transduction pathways, including the formation of new trichomes and root hairs or the expansion of root radial cells [2,8]. Other general defence/stress responses, such as phytoalexin production, are also modified by IR [7,9]. Furthermore, IR can affect the basal energetic metabolism of plants because of the effects of ROS on membranes, which include lipid peroxidation [10], subcellular organelle (chloroplasts, mitochondria and ER) destruction [11] and photosynthetic pigment alteration [12]. Another important effect of IR is DNA damage, which results in DNA strand breaks and chromosomal aberrations that can potentially be transmitted to the progeny [2,3]. The diversity and variability of the observed radiation effects suggest that homeostasis is controlled by a complex array of factors. A global analysis of the plant response to IR would be required to obtain molecular data and decipher the complex interactions. Global approaches to the study of ionising radiation are limited. The influence of IR on the plant transcriptome has been investigated [8,13,14], but to our knowledge, with the exception of two studies of the reserve proteins of the mature soybean and flax seeds [15,16], no data are available on the influence of IR on the plant proteome.

In this study, we analysed the proteomic response to a single exposure to a low/moderate dose of ionising radiation to identify specific enhanced pathways. As the response to IR likely reflects a combination of dose- and tissue-specific mechanisms to ensure a balanced response to stress, we analysed this response as a function of both factors. Irradiation doses were chosen on the basis of their effect on plant growth. Thus, while a 10 Gy irradiation does not have a visible phenotypic effect, a 40 Gy dose causes a slight but significant reduction in root growth. Although ROS production is assumed to be immediate, little is known about the delay in the molecular response after IR, and a kinetic approach (2, 24 and 72 h) was chosen to accommodate the long conservation of the unstable energetic state. The roots and rosettes were analysed separately due to their differing sensitivities to IR.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material and radiation treatment of plants

*Arabidopsis* seeds of the Col-0 ecotype were sterilised and sowed under sterile conditions on Petri dishes (12×12 cm) containing half strength MS medium (Sigma) supplied with 0.5% sucrose and 0.8% agar. After three days in the dark at 4 °C,

Petri dishes were transferred to a growth chamber (21 °C) under a 16 h light period per day with light at 115 μmol/m<sup>2</sup>/s.

Plantlets were irradiated in the Petri dishes at the 1.02 developmental stage (two rosette leaves >1 mm in length, ≈10th day of growth [17]) in a Hewlett–Packard Faxitron chamber. The X-radiation dose was 10 or 40 Gy (1.7 Gy/h), and an equivalent number of Petri dishes was used as a control (0 Gy). Plants were harvested 2, 24 and 72 h after irradiation, and the leaves and roots were frozen separately using liquid N<sub>2</sub> and stored at –80 °C until lyophilisation. Each experiment was conducted three times, i.e., 45 Petri dishes containing 18 seedlings each, for each dose and time. The sampling quantities of the roots were not sufficient; consequently the root biomass obtained for one replicate of each harvest time after irradiation, i.e., 2, 24 and 72 h, had to be pooled and compared as a function of the irradiation dose to conserve the three necessary biological repetitions required for statistical analysis.

### 2.2. Measurement of seedling growth and development

The root lengths of the plantlets were marked on the bottom of the Petri dishes before irradiation and before harvest. The roots were then photographed and measured with ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). To determine the fresh weights, three samples of six representative plants per box were weighed because the plants were too small for individual weighings. The data are presented as the mean±SEM (standard error of the mean) of three independent experiments.

### 2.3. Protein extraction and quantification

On ice, 17 to 37 mg dry weight of lyophilisate (around 300 mg of fresh material) were ground into powder. A TCA-acetone/phenol protein extraction protocol was used as previously described [18]. The proteins in the leaf and root extracts were dissolved in 200 μL or 100 μL of solubilisation buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 2% v/v Triton X-100, 100 mM DTT], respectively, with energetic agitation for 2 h. Protein contents were determined with a Bradford assay [19].

### 2.4. Protein analysis by 2-DE

2-DE was performed as described previously [20]. After the second dimension of migration, the gels were rinsed with distilled water and placed in Coomassie staining solution for 24 h [0.14% w/v Coomassie blue G-250, 2.6% v/v phosphoric acid, 11% w/v ammonium sulphate, 27.5% v/v methanol]. The gels were then washed for 3 min with Tris–H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5, and 1 min with 25% v/v methanol before the destaining step, which consisted of 24 h in 20% w/v ammonium phosphate. The staining process was repeated once to improve the visualisation.

All of the gels were scanned (see Fig. S1 in the Supplementary material), and the gel pictures were analysed separately for aerial parts and roots using the imaging software PDQuest v8.0.1 (Bio-Rad). The analysis included cleaning, cropping and filtering of the pictures, spot matching and normalisation of the size and intensity of the spots to minimise the effect of experimental factors. Normalisation was performed using the “local regression method” (LOESS) of the PDQuest software, in which the normalisation factor was calculated from a curve in



the scatter plot that minimised the distance to all points in the plot. The complete list of the obtained spot values is available in Table S1 of the Supplementary material.

### 2.5. Statistical analysis of 2-DE

The statistical analysis was performed with the software SPSS v17.0 and Excel. The spot values were transformed by a cubic root function to suit a normal law and to stabilise the standard deviations. The differential variations in the spot abundances between each irradiated condition and the corresponding non-irradiated control were tested with one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) for each time (2, 24 and 72 h). Inconsistent spots which were not present in all three of the biological replicates of a condition were not taken into account in these comparisons, and significantly variant spots with a variation lower than the biological variability coefficient (CV) were also removed from the dataset. The resulting list of differential spots was reduced by applying a “false discovery rate” test [21]. The means of the significant spots were then compared by a Duncan test ( $\alpha = 0.05$ ). When the presence or absence of spots correlated with one or several conditions, those spots were not submitted to the statistical treatment and their presence/absence was considered significant. The data for the statistical analysis are given in Tables S2–S4 of the Supplementary material.

### 2.6. MS/MS analysis and protein identification

The MS/MS analysis was performed at the UCO-SCAI proteomics facility, a member of the ProteoRed-ISCI network, with a 4700 Proteomics Analyser MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems) as previously described [20]. Peak-picking (4000 Series Explorer, version 3.5.3) was performed at a S/N threshold = 10, a local noise window width ( $m/z$ ) = 250 and a min peak width at full width half max (bins) = 2. The spectra were internally calibrated with peaks from trypsin autolysis (842.51, 1045.56 and 2211.11). The mass data were analysed with the 4000 Series Explorer Software version 3.5.3 (Applied Biosystems). Proteins were identified by a combined strategy consisting of a peptide mass fingerprint search and a MS/MS search of up to twelve peptide ions using GPS Explorer™ software version 3.5 (Applied Biosystems) in the NCBI nr database and the MASCOT v.1.9 search engine (<http://www.matrixscience.com>). We applied the following parameters: taxonomy restriction to Viridiplantae, one missed cleavage permitted, 100 ppm mass tolerance in MS and 0.2 Da mass tolerance for fragment ions, cysteine carbamidomethylation as a fixed modification and methionine oxidation as a variable modification. The Mascot score results and sequences of each ion matched in database are shown in the Supplementary material, Table S5.

## 3. Results

### 3.1. Growth effects of ionising radiation

The effects of IR on plant growth were preliminarily analysed using X-ray doses ranging from 5 to 100 Gy (data not shown), and 10 and 40 Gy doses and time of analysis up to 72 h were selected for the proteomic analysis. Both doses are low/

moderate doses for *Arabidopsis* plantlets grown until the 1.02 developmental stage because 10 Gy irradiation does not cause significant effects on plant growth, while the 40 Gy dose causes a significant decrease in root growth at 72 h ( $p = 1.87 \times 10^{-5}$ ) without drastically affecting development (Fig. 1). In addition, rosettes were less sensitive than roots because their fresh weights were not affected by 40 Gy IR treatment (Fig. 1A).

### 3.2. Distribution and overlap of significant IR-regulated spots on 2-DE gels

A mean of 677 or 636 spots was detected on 2-DE gels corresponding to root or aerial part analysis, respectively (see Table S2 in the Supplementary material). The IR treatments did not affect the number of detected spots from the roots ( $p = 0.269$ ), but the 40 Gy dose reduced the spot number from leaves at 2 and 72 h (–6.4% and –8.5%, Student's  $t$ -test  $p = 0.036$  and  $0.0009$ , respectively).

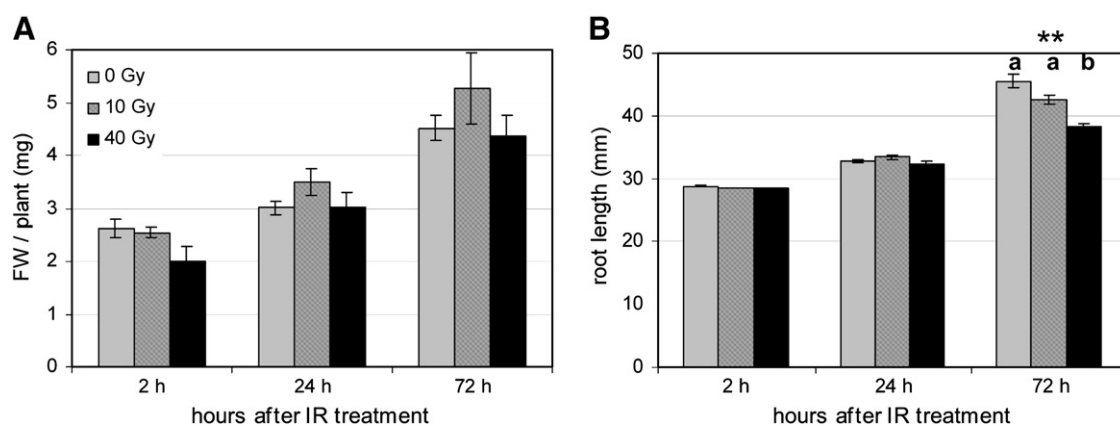
After statistical analysis, 145 variant spots in protein gels of the aerial parts were identified as significant. Among them, 54 were strictly up-regulated after irradiation, 74 were down-regulated and 17 were oppositely regulated depending on the dose (16) or time (1). In leaves, 36 and 54 proteins were solely up- or down-regulated by the 40 Gy dose, while 10 up- and 8 down-regulated proteins were 10 Gy-specific; the remaining proteins (8 up and 12 down) were affected by both doses. In contrast, the root response was more evenly distributed among the doses. Of the 27 variant spots from roots, 6 (3 up and 3 down) responded exclusively to 10 Gy, and 10 (2 up and 8 down) responded exclusively to 40 Gy, while 11 responded to both doses (3 up, 6 down, and 2 opposite).

Fig. 2A illustrates the distribution of the 185 resulting changes in regulation (without considering the overlaps between data sets collected at different time points), highlighting the important fold changes that occurred. The amplitude of the global response to the 10 Gy dose was lower (both in number of spots and fold changes) and more evenly distributed among up- and down-regulations, in contrast to the immediate down-regulation (48 spots) following the 40 Gy treatment. The strong response to the 40 Gy dose decreased and equilibrated by 24 and 72 h after irradiation. Most of the variant spots were dose-specific, but the proportion of spots regulated by both doses increased with time: 13% (9/71) at 2 h, 21% (9/43) at 24 h and 39% (17/44) at 72 h (Fig. 2B).

The lower amplitude of the response observed in roots (both in number of spots and fold changes, Fig. 2A) may be due to the pooling of the samples from the 3 time points (see **Material and methods**). However, the 40 Gy dose again induced a greater number of down-regulations and led to a stronger fold change than the 10 Gy dose.

### 3.3. Characterisation of proteins involved in the *Arabidopsis thaliana* response to radiation stress

Proteins that varied significantly in the 2-DE analysis were subjected to a detailed, individual MS/MS identification using MALDI-TOF-TOF mass spectrometry. The MS/MS analysis identified 118 proteins from the aerial parts and 26 from the roots, 7 of which were regulated in both tissues (i.e., the methionine adenosyl transferase MAT3, the receptor for



**Fig. 1 – Effect of ionising radiation on the aerial part fresh weight (A) and the root length (B). \*\*: significant ANOVA ( $p < 0.05$ ). a and b represent the classes given by the subsequent Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ).**

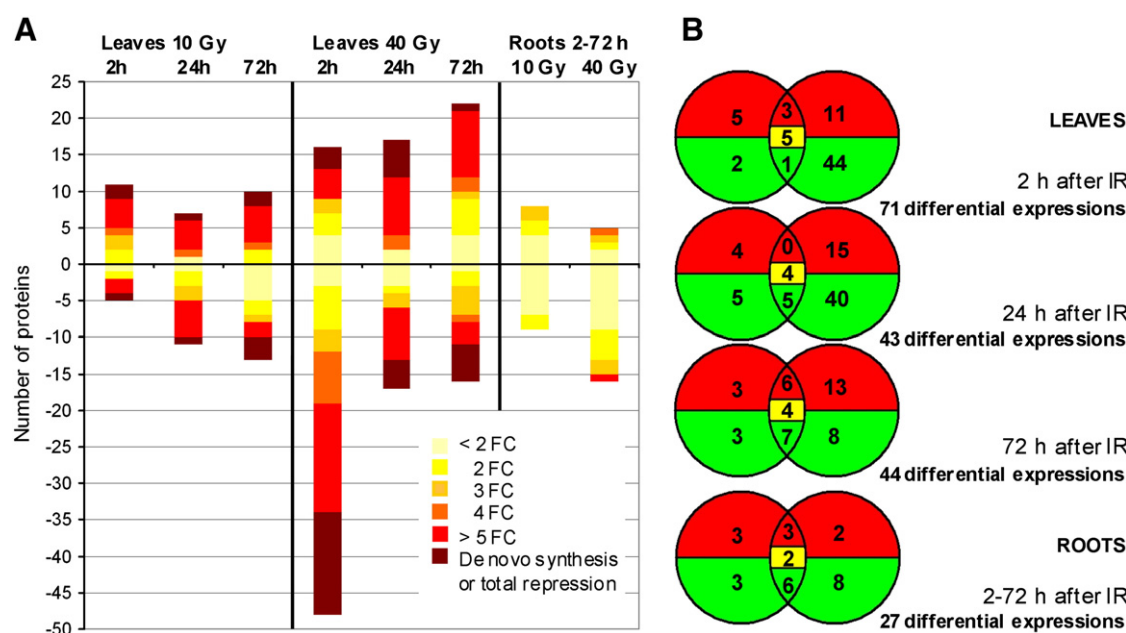
activated C kinase RACK1A, the mitochondrial elongation factor EF-Tu, the annexin ANNAT1 peroxidase, the chaperonin Hsp60, aspartate-semialdehyde dehydrogenase and fructose-bisphosphate aldolase). Their identities and functions are given in Table 1, and their distributions in the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) functional groups are detailed in Fig. 3. Proteins with no clearly ascertainable role were labelled as unclassified. The molecular weights, isoelectric points, relative volumes, and statistical analyses of the identified proteins are described in Supplementary Tables S3–S4. Only statistically significant changes in regulation ( $p < 0.05$ ) will be commented on here.

Clustering the regulated proteins into MIPS functional categories (Fig. 3) facilitated an analysis of the biological processes involved in the response to IR and the differences

between the doses. The majority of the proteins down-regulated by IR were involved in primary metabolism/energy; these categories were particularly affected by the 40 Gy treatment (41 over 74). Among proteins that were up-regulated, those related to cellular components, cellular communication and transcription became prominent after the 40 Gy treatment (Fig. 3). Despite their small number, proteins belonging to the two last classes likely regulate the response to the applied stress.

3.3.1. Effects of IR on energetic pathways in aerial parts

Both IR doses greatly affected the energetic pathways in the aerial parts, but the specific pathways were different for the different doses (Table 1). While the 10 Gy treatment had no effect on mitochondrial metabolism, isocitrate dehydrogenase



**Fig. 2 – (A) Protein expression after IR treatment (10 and 40 Gy) compared to the 0 Gy control at the selected time points (2, 24 and 72 h) on the aerial parts and roots of *A. thaliana* plants. Negative and positive values in the ordinate scale indicate down- and up-regulation respectively. FC = Fold change. (B) Corresponding Venn diagrams: green = down-regulated spots; red = over-expressed spots; yellow = spots oppositely regulated by the 10 and 40 Gy doses.**

**Table 1 – Identification of differentially variant proteins in the aerial parts and roots of *A. thaliana* after irradiation treatments. The given values are the log2 of the fold up- or down- regulation compared to the control. Bold: significantly different regulation after ANOVA test ( $p < 0.05$ ) and Duncan test between 0 Gy versus 10 Gy and 0 Gy versus 40 Gy for each time point ( $\alpha = 0.05$ ). rep: spot disappearance compared to the control 0 Gy; ind: spot appearance compared to the control 0 Gy. MIPS: functional classes catalogue from the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) website—Institute of Bioinformatics and Systems Biology (IBIS) of the Helmholtz Zentrum München ([http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/search\\_main\\_frame.html](http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/search_main_frame.html)). Abbreviation: clp = chloroplast; GLS = glucosinolate; meta.= metabolism; PM = Plasma membrane; ER = Endoplasmic reticulum.**

Gene ID	Identification	10 Gy			40 Gy			Metabolic pathway	Cellular compartment	MIPS	Spot
		2 h	24 h	72 h	2 h	24 h	72 h				
<i>Up-regulated proteins in aerial parts</i>											
Metabolism											
At2g36880	Methionine adenosyl transferase MAT3	-4.45	1.94	2.6	0.40	3.02	0.68	Amino acid meta.	PM	01.01	L5415
At5g35630	Clp glutamine synthetase GS2	-0.34	0.61	-0.08	1.77	1.45	1.62	Amino acid meta.	Chloroplast	01.01	L2401
At5g35630	Clp glutamine synthetase GS2	-0.09	0.48	0.30	0.67	1.15	0.89	Amino acid meta.	Chloroplast	01.01	L2405
At4g37930	Serine hydroxymethyltransferase SHM1	-1.44	-2.10	-1.30	-0.32	0.20	1.32	Amino acid meta.	Mitochondria	01.01	L9604
At1g11860	Aminomethyltransferase GDC-T	5.65	0.64	1.04	6.71	1.33	0.85	Amino acid meta.	Chloroplast, cytosol, mitochondrion	01.01	L8318
Energy											
At2g39730	Rubisco activase RCA	-0.46	2.13	0.67	-0.20	1.34	0.94	Photosynthesis	Chloroplast	18.02	L5308
At4g15510	PsbP protein (PSII)	-0.03	3.53	-3.19	-0.53	0.39	0.42	Photosynthesis	Thylakoid membrane	02.30	L3107
At1g42970	Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase B	-0.04	1.05	3.94	0.96	2.02	0.71	Photosynthesis	Stroma	02.30	L4417
At4g04640	Clp ATP synthase CF1 ( $\gamma$ subunit)	-1.62	-6.13	ind	1.79	-0.67	1.58	Photosynthesis	Thylakoid membrane	02.30	L5311
ArthCp029	Clp ATP synthase CF1 ( $\beta$ subunit)	-0.31	0.56	0.20	0.41	0.96	0.63	Photosynthesis	Thylakoid membrane	02.30	L3508
At1g13440	Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase C-2	0.09	-0.18	0.44	1.04	0.46	0.93	Glycolysis	Cytosol, mitochondria, cell wall, chloroplast	02.01	L7312
At2g39730	Rubisco activase RCA	-0.01	0.86	-0.57	1.07	1.66	0.13	Photosynthesis	Chloroplast	18.02	L1405
At5g66570	OEC33	-0.05	0.09	-0.17	0.61	0.73	0.65	Photosynthesis	Thylakoid membrane	02.30	L1116
At3g08590	2,3-Biphosphoglycerate mutase	-0.48	0.11	-0.99	0.46	0.80	-0.30	Glycolysis	Cytosol, Apoplast	02.01	L4603
At3g04120	Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase C-1	-1.37	0.82	0.11	-0.17	2.12	-0.45	Glycolysis	Cytosol	02.01	L7412
At4g38970	Fructose bisphosphate aldolase 2	-0.54	-0.65	-0.98	-0.99	2.27	2.57	Photosynthesis	Stroma, Plastoglobule	02.30	L2205
ArthCp029	Clp ATP synthase CF1 ( $\beta$ subunit)	2.28	1.94	1.59	1.95	2.52	2.77	Photosynthesis	Thylakoid membrane	02.30	L2502
At4g38970	Fructose bisphosphate aldolase 2	2.42	-1.20	-1.39	3.91	0.33	-1.33	Photosynthesis	Stroma, plastoglobule	02.30	L5213
At4g35260	Isocitrate dehydrogenase IDH1	0.27	1.80	-0.57	-4.41	5.40	-0.97	TCA cycle	Mitochondria	02.10	L8412
Protein synthesis, fate and stabilisation											
At1g72370	40kD ribosomal protein	2.09	1.39	1.36	-0.01	-0.09	7.60	Translation	Chloroplast, cytosol, nucleus, PM	12.01	L2305
At1g02560	Clp protease ClpP5	2.36	2.27	1.36	2.50	-4.67	-5.97	Protein degradation	Chloroplast	14.13	L5013
At1g09340	Clp RNA-binding protein CSP41B	-1.05	0.17	-0.77	1.04	0.45	-1.04	RNA maturation	Chloroplast	11.04	L8201
At4g02930	Mitochondrial elongation factor EF-Tu	-1.27	2.38	-0.96	0.12	7.02	3.80	Elongation factor	Mitochondria	12.04	L6409
At1g55490	Chaperonin CPN60B	-2.84	1.58	-1.41	-1.10	ind	5.95	Protein stabilisation	Chloroplast	14.01	L1607
At5g24490	30S ribosomal protein	-2.11	0	7.53	0.46	ind	8.10	Translation	Chloroplast	12.01	L4211
At2g33800	Ribosomal protein S5	-0.22	-0.87	-1.19	-0.43	0.05	1.42	Translation	Chloroplast	12.04	L8202
At5g50920	Clp protease subunit CLPC1	-0.05	-0.70	1.38	0.31	-0.10	1.29	Photosynthesis	Chloroplast	14.13	L4806
At5g50920	Clp protease subunit CLPC1	-0.17	-0.47	1.87	0.56	0.79	2.6	Photosynthesis	Chloroplast	14.13	L4809
At5g24490	30S ribosomal protein	0.30	-1.91	2.88	0.80	1.27	3.54	Translation	Chloroplast	12.01	L5202
At1g62750	Elongation factor G putative	0.25	-0.66	3.57	-2.09	-1.50	2.13	Translation	Chloroplast	12.04	L2809

Table 1 (continued)

Gene ID	Identification	10 Gy			40 Gy			Metabolic pathway	Cellular compartment	MIPS	Spot
		2 h	24 h	72 h	2 h	24 h	72 h				
At3g23990	Chaperonin Hsp60 Transcription	7.19	-8.16	0.00	ind	1.59	6.72	Protein assembly	Mitochondria	14.10	L2714
At3g63450	RNA binding protein	0.07	0.21	0.48	-0.02	0.53	1.92	Transcription	Unknown	11.04	L8711
At2g07750	Clp DEAD box RNA helicase	-1.05	0.11	2.81	0.76	-0.22	7.04	Transcription	Chloroplast	11.04	L8107
At3g14210	Cell rescue defence and virulence Epithiospecifier modifier GLL65/ESM1	1.06	2.43	-0.65	0.43	3.14	1.31	GLS hydrolysis	Apoplast, chloroplast, cytosol, nucleus, peroxisome, vacuole	32.01	L8405
At2g41530	S-Formyl glutathione hydrolase	-3.95	3.29	0.42	-3.60	-3.32	-6.36	Detoxification	Apoplast	32.07	L5222
At1g35720	Annexin ANNAT1	-0.75	-5.32	2.47	3.34	2.88	1.07	ROS defence	Apoplast, chloroplast, cytosol, nucleus, peroxisome, vacuole	32.07	L2311
At5g03630	Monodehydroascorbate reductase 2	0	0	0	ind	8.78	10.30	ROS defence	Cytosol	32.07	L2409
At4g35090	Peroxisomal catalase 2	0	-1.25	10.67	ind	-2.90	10.76	ROS defence	Peroxisome	32.07	L8616
At3g16530	Legume lectin family protein	-0.13	0.02	-0.14	0.05	0.32	1.09	Defence	Cell wall, nucleus, apoplast	32.05	L8109
At5g49910	Clp Hsp 70-2	0.05	0.76	3.63	0.26	2.27	6.21	Protein folding	Chloroplast	32.01	L0802
At1g18080	Cell communication Receptor for activated C kinase RACK1A	-2.46	-2.64	6.69	-2.36	2.88	6.37	Kinase transduction	Chloroplast, cytosol	30.01	L8213
At4g05190	Cell component Kinesin ATK5	0.13	0.24	1.48	0.12	2.30	1.33	Cytoskeleton	Nucleus	42.04	L8504
At5g02240	Unknown Gene product from At5g02240	-2.08	-5.17	2.58	1.16	2.53	0	Unknown	PM, apoplast	99	L6217
At5g01010	Unknown protein	0.42	-0.74	1.32	0.99	5.86	3.58	Unknown	Unknown	99	L5112
<i>Down-regulated proteins in aerial parts</i>											
<i>Metabolism</i>											
At2g21250	Metabolism Mannose 6-phosphate reductase	-2.42	0.97	-0.48	-1.04	3.28	-0.10	Carbohydrate meta.	Unknown	01.05	L7209
At4g37930	Serine hydroxymethyltransferase SHM1	-0.16	-0.24	-0.61	-0.74	-0.37	-0.03	Amino acid meta.	Mitochondria	01.01	L8515
At4g23100	Glutamate cysteine ligase GSH1	0.25	-0.36	-0.53	-0.62	-0.89	-0.50	Glutathione meta.	Stroma	01.07	L3503
At3g48730	Glutamate-semialdehyde aminomutase GSA2	0.07	-0.44	-0.18	-1.00	-0.52	-1.03	Tetrapyrrole meta.	Chloroplast	01.20	L5413
At2g15620	Ferredoxin-nitrite reductase	-0.78	-1.00	-0.26	-1.45	-0.15	-0.01	Nitrogen meta.	Chloroplast, apoplast	01.02	L5608
At5g14740	$\beta$ -Carbonic anhydrase CA2	-0.37	0.02	-0.41	-1.49	-0.63	-0.15	Carbohydrate meta.	Cytosol, chloroplast	01.05	L4103
At2g45300	EPSP synthase	-0.25	0.82	-0.61	-1.82	-0.29	-0.29	Shikimate meta.	Chloroplast	01.05	L2407
At5g14740	$\beta$ -Carbonic anhydrase CA2	-0.30	-0.38	-0.41	-1.92	-0.92	-0.70	Carbohydrate meta.	Cytosol, chloroplast	01.05	L3103
At3g01500	$\beta$ -Carbonic anhydrase CA1	0.78	-1.49	-1.04	-3.03	-1.42	-1.36	Carbohydrate meta.	Cytosol, chloroplast	01.05	L3105
At1g14810	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	-1.15	0.03	0.32	-4.18	-1.79	0.12	Amino acid meta.	Stroma, mitochondrion	01.01	L3311
At4g17050	Ureidoglycine aminohydrolase UGLYAH	0.15	1.87	0.19	-4.67	-0.58	0.43	Nucleotide meta.	ER	01.03	L8007
At5g17920	Methionine synthase ATMS1	0.06	-1.17	0.48	-4.79	-2.02	-0.73	Amino acid meta.	Cytosol	01.01	L7810
At1g70580	Glutamate:glyoxylate aminotransferase GGAT2	-1.03	-0.47	0.15	-6.86	-3.04	-0.44	Amino acid meta.	Peroxisome	01.01	L8524
At2g35040	IMP cyclohydrolase	0.09	-1.15	0.20	rep	-0.71	0.08	Nucleotide meta.	Stroma	01.03	L6613
At5g19550	Aspartate transaminase ASP2	-0.14	0.70	-2.79	rep	-3.61	-0.68	Amino acid meta.	Cytosol, PM, cell wall	01.01	L8415
At5g11670	Malate dehydrogenase AtNADP-ME2	0.06	-0.02	-0.17	-0.31	-0.87	-0.04	Carbohydrate meta.	Chloroplast, cytosol	01.05	L6608
At3g58610	Ketol-acid reductoisomerase	0.16	-0.46	0.26	-0.97	-2.54	-0.47	Amino acid meta.	Chloroplast, cell wall	01.01	L5609

Table 1 (continued)

Gene ID	Identification	10 Gy			40 Gy			Metabolic pathway	Cellular compartment	MIPS	Spot
		2 h	24 h	72 h	2 h	24 h	72 h				
At3g57610	Adenosyl succinate synthase	-1.49	0.46	-2.44	0.30	-5.37	-5.03	Nucleotide meta.	Apoplast, chloroplast	01.03	L6509
At5g27380	Glutathione synthase GSH2	-0.28	0.33	-0.27	-1.52	-1.39	-0.24	Glutathione meta.	Chloroplast, cytosol	01.07	L4509
At3g48990	4-Coumarate-CoA ligase	0.14	0.33	0.42	-1.81	-1.87	-0.85	Flavonoid meta.	Apoplast, chloroplast	01.20	L7602
At5g65010	Asparagine synthase ASN2	-0.33	-0.45	-0.25	-2.14	-1.84	-2.21	Amino acid meta.	Unknown	01.01	L7714
At1g23310	Glutamate:glyoxylate aminotransferase GGAT1	0.50	-0.05	-1.10	0.32	0.11	-3.05	Amino acid meta.	Peroxisome	01.01	L7515
At5g60600	Hydroxymethylbutenyl di-P synthase	-0.14	-1.51	0.65	1.05	0.29	-5.04	Lipid meta.	Chloroplast	01.06	L5702
At1g48860	Phosphoshikimate carboxyvinyltransferase	0.54	0.27	-1.30	-1.26	-0.71	-1.72	Shikimate meta.	Chloroplast	01.05	L2503
At5g01410	Glutamine amidotransferase PDX1	-1.40	0.49	-3.68	-1.41	-0.67	-1.74	Amino acid meta.	Cytosol, ER, PM	01.01	L5215
At1g01090	Pyruvate dehydrogenase E1 $\alpha$	0.27	rep	-7.27	-0.09	rep	-3.90	Lipid meta.	Chloroplast	01.06	L6305
At5g46290	3-Ketoacyl-ACP synthase KASI	-2.90	-0.24	0.00	rep	0.08	6.77	Lipid meta.	Chloroplast	01.06	L7514
Energy											
At4g04640	Clp ATP synthase CF1 ( $\gamma$ subunit)	-0.06	-0.22	-0.16	-0.60	-0.01	-0.36	Photosynthesis	Thylakoid membrane	02.30	L7206
At5g66190	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> oxidoreductase FNR1	-0.03	-0.32	-0.29	-1.07	-0.52	-0.43	Photosynthesis	Chloroplast	20.01	L5204
At5g20080	NADH cytochrome b5 reductase	-1.30	2.87	-2.55	-4.25	-0.42	-0.80	Respiration	Mitochondrion	02.13	L8111
ArthCp035	Cytochrome f apoprotein	-0.01	0.37	-1.22	-7.17	-4.30	-0.75	Photosynthesis	Thylakoid membrane	02.11	L7218
At1g29910	CAB2A protein	1.28	1.01	0.61	-2.82	-4.01	-5.90	Photosynthesis	Thylakoid membrane	02.30	L1120
At3g26650	Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase A-2	-0.07	-0.55	0.12	-2.75	-2.79	-0.32	Photosynthesis	Chloroplast	02.30	L8311
At4g35260	Isocitrate dehydrogenase IDH1	0.27	1.80	-0.57	-4.41	5.40	-0.97	TCA cycle	Mitochondria	02.10	L8412
At3g52930	Fructose biphosphate aldolase	0.19	0.32	0.28	0.69	0.11	-1.05	Photosynthesis	Apoplast, cell wall, chloroplast, cytosol, mitochondria, PM	02.01	L6302
At4g04640	Clp ATP synthase CF1 ( $\gamma$ subunit)	-0.34	0.23	0.29	0.54	0.52	-1.06	Photosynthesis	Thylakoid membrane	02.30	L6204
At1g61520	PSI protein LHCA3	0.50	0.28	-0.42	-0.89	0.33	-2.02	Photosynthesis	Thylakoid membrane	02.30	L4005
ArthCp007	Clp ATP synthase CF1 ( $\alpha$ subunit)	-0.50	1.05	0.16	0.01	2.88	-2.45	Photosynthesis	Thylakoid membrane	02.30	L3613
At1g09780	2,3-Biphosphoglycerate mutase	-1.54	-2.35	-1.79	-1.72	-2.33	0.22	Glycolysis	Cytosol, apoplast	02.01	L3614
Protein synthesis, fate and stabilisation											
At5g39830	DEG8 protease	1.13	2.95	-1.50	rep	0.65	-1.68	Protein degradation	Chloroplast	14.13	L5312
At2g40660	tRNA aminoacylation activity protein	-0.09	1.14	0.50	rep	-0.75	1.08	Translation	Unknown	12.10	L9405
At3g62120	Aminoacyl tRNA ligase class II	-0.39	-0.24	-0.12	-1.75	-3.20	-1.45	Translation	PM	12.10	L7601
At5g50920	Clp protease subunit CLPC1	-1.14	1.38	2.04	0.03	1.98	-5.25	Photosynthesis	Chloroplast	14.13	L3808
At5g26742	Clp DEAD box RNA helicase RH3	-0.54	0.13	0.01	-3.84	-2.86	-0.18	RNA modification	Chloroplast	11.06	L7811
Transcription											
At4g35250	Vestitone reductase-related protein	-0.66	0.69	-1.06	-1.98	-0.07	0.09	Nitrogen utilisation	Chloroplast	11.04	L8322
Cell rescue defence and virulence											
At4g35090	Peroxisomal catalase 2	0.91	-1.50	2.39	-0.05	-0.98	0.34	ROS defence	Peroxisome	32.07	L8614
At5g16970	2-Alkenal reductase	0.10	1.32	-0.56	-1.03	-0.91	-1.68	Detoxification	Cytosol, nucleus	32.07	L5210
At1g07890	L-Ascorbate peroxidase APX1	0.47	0.00	-6.38	rep	-1.58	0.83	ROS defence	Cytosol	32.07	L5114
At3g55040	Glutathione S-transferase GSTL2	0.53	4.95	rep	-1.95	5.42	rep	Detoxification	Stroma	32.07	L1121

Table 1 (continued)

Gene ID	Identification	10 Gy			40 Gy			Metabolic pathway	Cellular compartment	MIPS	Spot
		2 h	24 h	72 h	2 h	24 h	72 h				
Cell communication											
At1g48630	Receptor for activated C kinase RACK1B	-0.20	<b>-1.69</b>	-0.72	-0.14	0.68	0.85	Kinase transduction	Cytosol	30.01	L8208
At3g18130	Receptor for activated C kinase RACK1C	-2.01	<b>-2.69</b>	-1.58	-0.10	0.03	1.71	Kinase transduction	Nucleolus	30.01	L8214
Cell transport											
At1g20260	Vacuolar ATP synthase (B subunit)	0.28	0.33	0.42	<b>-1.99</b>	-1.29	-0.85	Transmembrane	Vacuolar membrane	20.03	L1506
At1g20260	Vacuolar ATP synthase (B subunit)	-0.45	-0.15	-0.78	<b>-2.81</b>	-1.91	-2.44	Transmembrane	Vacuolar membrane	20.03	L1609
At3g20000	Component of TOM receptor complex	0.37	-0.15	0.16	<b>-4.19</b>	1.26	-4.09	Transmembrane	Mitochondria	20.03	L7314
At1g78900	Vacuolar ATP synthase (A subunit)	-0.68	<b>-1.63</b>	-0.55	-1.40	<b>-2.53</b>	-1.33	Transmembrane	Vacuolar membrane	20.03	L2715
Cell cycle											
At5g48600	Structural maintenance of chromosome SMC3	1.58	<b>-2.32</b>	-1.58	4.17	0.55	0.00	Cell cycle	Nucleus	10.03	L6006
Cell component											
At5g09810	Actin ACT7	0.00	0.18	<b>-0.67</b>	-0.01	-0.22	-0.67	Cytoskeleton	Cytoskeleton, cell wall, mitochondrion, nucleolus, PM	42.04	L3405
Unknown											
At1g52100	Jacalin lectin family protein	-0.05	0.35	-0.19	<b>-2.03</b>	-2.10	-0.63	Unknown	PM	99	L8521
At1g16080	Unknown protein	-0.22	1.02	-2.13	<b>-3.87</b>	-0.98	-1.94	Unknown	Unknown	99	L3108
At1g11430	DAG protein, putative	0.95	0.00	<b>rep</b>	-2.82	4.73	<b>rep</b>	Unknown	Chloroplast	99	L4010
At1g10160	Transposable element gene	-0.30	<b>-1.06</b>	-0.24	-0.41	<b>-0.86</b>	1.06	Unknown	Unknown	99	L3712
<i>Opposite regulated proteins in aerial parts within irradiation doses</i>											
Metabolism											
At3g16420	PYK10 binding protein JAL30/PBP1	<b>rep</b>	-1.77	-2.93	<b>1.64</b>	1.88	-2.44	GLS hydrolysis	Cytosol, nucleus	14.01	L2213
At4g29840	Threonine synthase	<b>-2.78</b>	8.28	-2.45	-1.13	<b>ind</b>	-0.76	Amino acid meta.	Chloroplast	01.01	L6606
At5g35630	Clp glutamine synthetase GS2	-0.17	-0.23	<b>-0.25</b>	-0.22	0.34	<b>0.33</b>	Amino acid meta.	Chloroplast	01.01	L3402
At1g32060	Phosphoribulokinase PRK	-0.11	0.13	<b>-0.27</b>	<b>0.54</b>	0.53	<b>0.23</b>	Nucleotide meta.	Chloroplast	01.03	L3305
At3g02230	Cellulose synthase (UDP-forming)	0.01	<b>0.22</b>	-0.42	-0.44	<b>-0.47</b>	-0.38	Cellulose meta.	Golgi, Cytosol	01.05	L4307
At2g39730	Rubisco activase RCA	-0.17	0.86	<b>-0.55</b>	-0.06	1.15	<b>0.33</b>	Photosynthesis	Chloroplast	18.02	L4303
Protein synthesis, fate and stabilisation											
At5g50920	Clp protease subunit CLPC1	<b>-0.92</b>	-1.42	2.56	<b>0.59</b>	1.21	2.66	Photosynthesis	Chloroplast	14.13	L3810
At4g20360	Clp elongation factor, EF-Tu	-0.17	<b>-0.6</b>	0.49	0.22	<b>0.44</b>	0.78	Translation	Chloroplast	12.04	L4403
At1g26630	Elongation factor ELF5A-2	0.20	<b>-2.87</b>	-0.08	0.07	<b>0.98</b>	1.76	Translation	Nucleus	12.04	L5002
At3g12490	Cysteine protease inhibitor, putative	-4.22	<b>3.94</b>	-1.37	-5.54	<b>rep</b>	-1.62	Cysteine degradation	ER	18.02	L6118
Cell rescue defence and virulence											
At3g14210	Epithiospecifier modifier 1 GLL65/ESM1	<b>1.80</b>	3.58	2.22	<b>rep</b>	5.67	-4.88	GLS hydrolysis	Apoplast, chloroplast, cytosol, nucleus, peroxisome, vacuole	32.01	L8416
At1g62740	Stress-inducible protein	0.14	-0.37	<b>1.00</b>	0.10	-1.07	<b>-1.76</b>	Unknown	Cytosol, nucleus, PM	32.01	L6711
Unknown											
At3g18890	Unknown clp protein	-0.05	1.05	<b>ind</b>	<b>rep</b>	1.30	<b>ind</b>	Unknown	Chloroplast	99	L2908
<i>Up and down-regulated proteins in roots</i>											
Metabolism											
At2g36880	Methionine adenosyl transferase MAT3		-0.27			<b>0.40</b>		Amino acid meta.	PM	01.01	R4417
At2g43710	Stearoyl-ACP desaturase SSI2		<b>1.12</b>			<b>1.42</b>		Lipid meta.	Stroma	01.06	R4205

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Gene ID	Identification	10 Gy			40 Gy			Metabolic pathway	Cellular compartment	MIPS	Spot
		2 h	24 h	72 h	2 h	24 h	72 h				
At1g12050	Fumarylacetoacetase, putative		-0.75		0.22		Amino acid meta.	Unknown	01.01	R2405	
At5g65020	Annexin ANNAT2		0.03		-0.24		Carbohydrate meta.	Cytosol	01.05	R4105	
At1g14810	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase		-0.36		-0.55		Amino acid meta.	Stroma, mitochondrion	01.01	R2204	
At5g39320	UDP-glucose 6-dehydrogenase		-1.16		-1.48		Carbohydrate meta.	Cytosol, nucleus	01.05	R3509	
Energy											
At3g52930	Fructose biphosphate aldolase		0.66		-0.09		Photosynthesis	Apoplast, cell wall, chloroplast, cytosol, mitochondria, PM	02.01	R4309	
At2g01140	Fructose biphosphate aldolase, putative		1.79		2.06		Photosynthesis	Chloroplast, mitochondria, plastoglobule	02.01	R5203	
At5g08670	Mitochondrial ATP synthase ( $\beta$ -subunit)		-1.05		-0.61		Respiration	Mitochondria	02.13	R2505	
At2g05710	Aconitase ACO3		0.44		-0.39		Respiration	Mitochondria, cytosol	02.04	R4802	
Protein synthesis, fate and stabilisation											
At3g09440	Heat shock cognate 70 kDa protein 3		-0.94		0.64		Protein stabilisation	Apoplast, cell wall, cytosol, PM, vacuole, chloroplast	14.01	R0808	
At3g23990	Chaperonin Hsp60		0.10		-0.49		Protein assembly	Mitochondria	14.10	R2702	
At3g25230	Rotamase FKBP ROF1		-0.37		-0.74		Protein folding	Cytoplasm, nucleus	14.01	R2705	
At4g02930	Mitochondrial elongation factor EF-Tu		0.05		-0.21		Translation	Mitochondria	12.04	R5308	
At5g51070	ClpD protease ERD1		0.44		-0.63		Protein degradation	Plastid	14.13	R7512	
At3g11830	T-complex protein 1 ( $\beta$ -subunit)		0.02		-1.01		Protein folding	Unknown	14.01	R5602	
At1g43190	Polypyrimidine tract-binding protein		-0.25		-1.13		Elongation factor	Nucleus, cytosol	11.04	R7509	
At5g20720	Clp chaperonin CPN20		-0.61		-0.87		Protein folding	Chloroplast	32.01	R3001	
At5g58290	26S proteasome subunit RPT3		-0.49		-1.59		Protein degradation	Cell wall, PM, nucleus	14.13	R2409	
Transcription											
At3g49240	Emb1796		0.22		-5.32		RNA polymerase regulator	Chloroplast, mitochondria	41.03	R2308	
Cell rescue defence and virulence											
At3g16470	Myrosinase binding protein JAL35/JR1		0.62		0.21		GLS hydrolysis	Chloroplast, PM, nucleus, vacuole	32.01	R2403	
At1g35720	Annexin ANNAT1		-0.27		1.76		ROS defence	Apoplast, cell wall, PM, cytosol, vacuole	32.07	R1206	
At3g09260	$\beta$ -Glucosidase PYK10 3D precursor		0.41		0.43		GLS hydrolysis	ER body, PM, peroxisome, vacuole	01.05	R8705	
At1g54000	Myrosinase-associated protein GLL22		-0.36		-0.15		GLS hydrolysis	Apoplast, vacuole	32.01	R8305	
Cell communication											
At1g18080	Receptor for activated C kinase RACK1A		-0.36		-1.43		Kinase transduction	Chloroplast, cytosol	30.01	R8212	
Unknown											
At2g21620	Response to desiccation protein RD2		1.86		-1.04		Unknown	Unknown	32.01	R3008	

1 (IDH1) varied widely after the 40 Gy treatment, decreasing at 2 h and over-expressing at 24 h. In chloroplast metabolism, exposure to 10 Gy increased the levels of three proteins that affect the Calvin cycle (fructose-biphosphate aldolase (2 h), rubisco activase (RCA) (24 h) and GA3PDH-B (72 h)) and two proteins that participate in stromal water splicing (PsbP at

24 h) and photophosphorylation (clp ATP-synthase CF1 $\gamma$  at 72 h). In contrast, although the 40 Gy dose up-regulated two Calvin cycle enzymes, the levels of GA3PDH-A2, as well as some constituents of light harvesting complexes, photosynthetic electron transport proteins and stromal ATPases, were strongly reduced until 24 h. Finally, the 40 Gy dose also

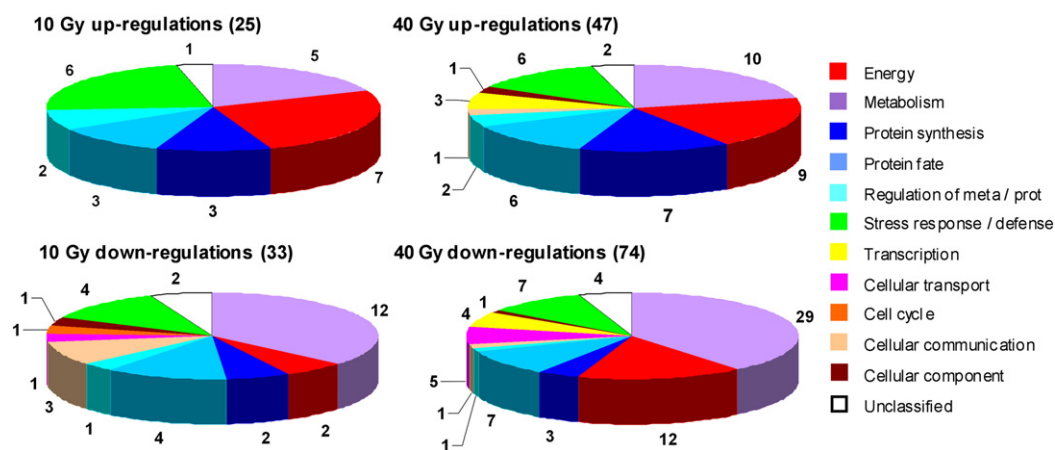


Fig. 3 – Functional classification of the differentially expressed proteins in the aerial parts and roots after IR. Adapted from the categories defined by the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) [<http://mips.gsf.de/projects/funecat>].

affected glycolysis by down-regulating 2,3-biphosphoglycerate mutase (2,3-BPG) and up-regulating GA3PDH-C1 and GA3PDH-C2, both of which are control points.

3.3.2. Effects of IR on amino acid metabolism

The 40 Gy treatment had a particular effect on photorespiratory enzyme levels. Two isoforms of peroxisomal glutamate: glyoxylate aminotransferase (GGAT1 and GGAT2) were down-

regulated. The aminomethyltransferase GDC-T (glycine decarboxylase T subunit), which catalyses the tetrahydrofolate-dependent cleavage of glycine in mitochondria, was immediately up-regulated, and the subsequent serine hydroxymethyltransferase SHM1 was also up-regulated. In contrast, the 40 Gy dose appeared to reduce chloroplast glutathione biosynthesis (as suggested by the decrease in the GSH1 and GSH2 spots) and strongly enhance glutamine synthetase GS2 (three spots, one of which showed a 3-

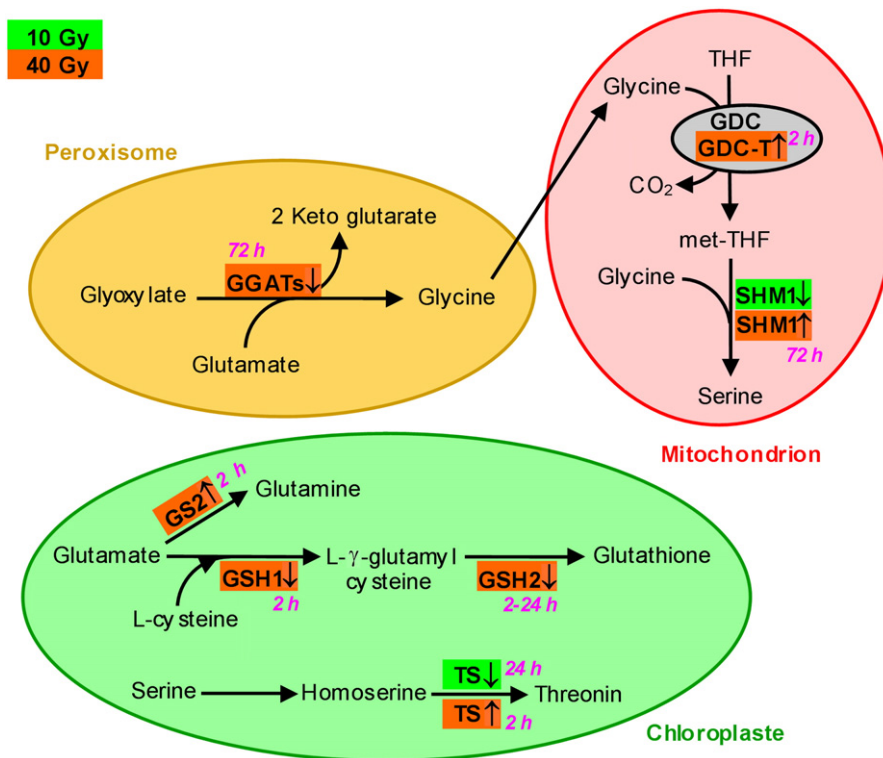


Fig. 4 – Schematic representation of the regulation of enzymes in amino acid metabolism after exposure to 10 or 40 Gy ionising radiation. ↑, up-regulation; ↓, down-regulation; GDC, glycine decarboxylase complex; GDC-T, aminomethyltransferase subunit T (At1g11860); SHM1, serine hydroxymethyltransferase 1 (At4g37930); TS, threonine synthase (At4g29840); THF, tetrahydrofolate; met-THF, N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methylene tetrahydrofolate; GGATs, peroxisomal glutamate:glyoxylate aminotransferase GGAT1 and GGAT2 (At1g23310 and At1g70580); GSH1, glutamate cysteine ligase (At4g23100); GSH2, glutathione synthase (At5g27380); GS2, glutamine synthetase (At5g35630).



fold increase). The levels of three enzymes related to aspartate utilisation were also reduced (aspartate transaminase, asparagine synthase and aspartate-semialdehyde dehydrogenase). Some of the photorespiratory enzymes were also regulated by the 10 Gy dose (Fig. 4).

### 3.3.3. Up-regulation of different ROS defence systems after the 10 and 40 Gy treatments

The 40 Gy exposure immediately enhanced some of the classical ROS detoxification enzymes, such as monodehydroascorbate reductase (glutathione-ascorbate cycle), catalases and peroxidases. The peroxidase annexin ANNAT1, which participates in ROS defences [22], was notably increased in both leaves and roots (4-fold  $\gg$  and  $\ll$  3-fold, respectively). However, the peroxidase APX1, which is also part of the glutathione-ascorbate cycle, was simultaneously repressed.

In contrast, none of these enzymes were up-regulated by the 10 Gy dose, and two detoxification enzymes, catalase 2 and a glutathione-S-transferase, were actually down-regulated in leaves. However, the glucosinolate (GLS) hydrolysis pathway appears to be part of the 10 Gy response, with isothiocyanate (ITC) production in leaves as a potential target. Indeed, five proteins of the PYK10 hydrolysing complex (myrosinase) formed by  $\beta$ -glucosidase homodimers and JAL and GLL partners [23] were regulated by this dose. The epithiospecifier modifier GLL65/ESM1, which favours hydrolysis to isothiocyanate, was greatly over-expressed in leaves. Furthermore, the JAL30/PBP1 protein, which has been described as an “inhibitor-type lectin” of PYK10 complex polymerisation [23], was totally repressed. In roots, the PYK10  $\beta$ -glucosidase and the jasmonate-responsive JAL35/JR1 protein levels increased. However, the expression in roots of the GLL22 myrosinase partner was slightly decreased. The function of GLL22 is unknown, but the relative similarity of its amino acid sequence with ESM1 suggests an ESM1-like activity [23]. After 40 Gy irradiation, JAL30/PBP1 was enhanced (3-fold), which may prevent PYK10 complex polymerisation, and GLL65/ESM1 was completely repressed in leaves.

### 3.3.4. RNA processing and protein synthesis and fate after the 40 Gy dose

In leaves, the 40 Gy dose affected two chloroplast DEAD box RNA helicases; one was down-regulated at 2 and 24 h (RH3), and the other was enhanced at 72 h (RH33). The RNA-binding protein CSP41B was immediately over-expressed after this dose. Several proteases were also involved in the IR response, i.e., ClpP5, ClpC1, ClpD and DEG8, most of which are implicated in the same stromal proteolytic system (ClpPRS complex). ClpP5 was up-regulated in leaves 2 h after 10 Gy treatment, while ClpD was down-regulated in roots after the 40 Gy treatment. ClpC1 appeared on gels in several close variant spots (possibly representing different states of the protein): L3810 [ $M_r$  218; pI 5.65], L4806 [ $M_r$  219; pI 5.8], L4809 [ $M_r$  221; pI 5.9] and L3808 [ $M_r$  219; pI 5.6]. Based on the theoretical value [ $M_r$  103.6; pI 6.36], ClpC1 appears to group in dimers. Only L3810 was differentially expressed at 2 h, with down-regulation by 10 Gy and up-regulation by 40 Gy. The other three spots were affected by IR at 72 h; L4806 was up-regulated by both doses, and L4809 and L3808 were respectively up- and down-regulated by 40 Gy. Additionally, the

level of the protease DEG8, a serine-type peptidase involved in the cleavage of photodamaged D2 protein in PSII, decreased in 40 Gy-treated leaves [24]. Concurrently, the chaperones CPN60 $\beta$  and Hsp70 were over-expressed in leaves at 24 and 72 h, respectively.

### 3.3.5. The RACK1 family appears to be involved in radiation-induced signal transduction

Our proteomic data show that the protein levels of the three orthologous receptors for activated C kinase (i.e. RACK1A, RACK1B and RACK1C) were modified during the IR response. In leaves, the 10 Gy dose led to a reduction of the amount of RACK1B and RACK1C, while the 40 Gy dose enhanced RACK1A accumulation. In contrast, the RACK1A form was reduced in roots in a dose-dependent manner.

## 4. Discussion

After irradiation, root growth was only affected by the 40 Gy dose, while the aerial parts were not affected by any dose (Fig. 1). The roots are more sensitive than the aerial parts to moderate doses of radiation and have even been used as a marker of very low chronic irradiation in *Arabidopsis* plants receiving 1.34 Gy during a 24-day period [5]. The choice of a 10/40 Gy comparison in this work seems judicious, as *A. thaliana* plants reacted differently to both doses on a short time scale, suggesting that differences would also occur at the proteome level. Indeed, proteomics revealed important metabolic changes after IR treatments that differed between the two doses. Considering the dynamic range of the 2-DE (three orders of magnitude, around 700 proteins in our analysis), we identified a relatively high number of proteins by 2-DE/MS/MS analysis (Figs. 2–3). Thus, we managed to identify 118 and 27 early response proteins in the aerial parts and roots, respectively, after exposure to IR.

X-radiation-induced alteration of energy/metabolism-related proteins was one of the most prominent changes (Fig. 3 and Table 1). Approximately half of the proteins in this category were involved in chloroplast function. Some photosynthesis (light and dark phases)-related proteins were up-regulated after the 10 Gy treatment, while the 40 Gy dose down-regulated six proteins involved in photosynthetic electron transport and photophosphorylation. Thylakoid membrane proteins are affected by numerous stresses, which has been associated with decreased photosynthetic activity [25]. In the case of IR, the effect of 40 Gy exposure on chloroplast proteins seems to be an active and targeted down-regulation rather than a secondary consequence of thylakoid membrane disturbance, given the increased levels of OEC33 and the chloroplast ATPase CF1 $\beta$ . The immediate down-regulation of the glutamate-1-semialdehyde aminomutase GSA2 after 40 Gy exposure further suggests a down-regulation of photosynthesis. This enzyme is one of the early steps of tetrapyrrole biosynthesis, the intermediates of which participate in controlling the gene expression of nuclear-encoded chloroplast proteins [26]. A decreased level of GAS2 could also result in a decrease of chlorophyll content, which would prevent photosynthetic protein stabilisation. The subunits of the thylakoid ATPase complex (photophosphorylation) were differentially regulated in

response to the two doses of IR. While the 40 Gy treatment resulted in the down-regulation of CF1 $\alpha$  and CF1 $\gamma$  and the up-regulation of CF1 $\beta$ , the 10 Gy treatment reduced only the CF1 $\alpha$  level. Finally, stromal enzymes were also affected by IR, but, interestingly, some Calvin–Benson cycle enzymes were maintained under 40 Gy exposure. This also seems to be the case for rubisco because, although its own level was not quantifiable because of spot saturation, RCA and its reported protecting partner during stress, CNP60 $\beta$  [27], were up-regulated.

Our dataset contains several attractive candidates that could act on the described modifications of the chloroplast pathways. After 40 Gy exposure, down-regulation of chloroplast proteins could be partially effected at the post-translational level, as several of the IR-responsive proteins corresponded to subunits of the stromal ClpPRS protease complex (i.e. ClpP5 and ClpC1). ClpPRS is a double heptameric ring complex that can include eight types of proteases, i.e., B, C, D, X, P, R, S and T [28], and a deficiency in ClpPRS accumulation causes a reduction in thylakoid proteins [29]. Interestingly, both IR doses affected the ClpC1 subunit, a Hsp100 chaperone involved in PSI and PSII protein turnover [30], but with different patterns. The 10 Gy exposure reduced the ClpC1 level immediately, while the effect of the 40 Gy dose was delayed (the reason for the ClpC1 spot diversity we obtained is unknown; see Results Section 3.3). Supporting ClpPRS involvement in the post-translational response to IR, the abundance of the catalytic subunit ClpP5 increased 5-fold immediately after 10 Gy exposure, and the ClpD subunit was also regulated in plastids of root tissues after 40 Gy exposure. Proteomics also suggested a post-transcriptional contribution to the chloroplast response to the higher IR dose. First, the RNA-binding protein CSP41B increased 2-fold in leaves immediately after 40 Gy exposure. CSP41B enhances both plastid transcription and translation [31] and also accumulates during oxidative stress [32]. Secondly, two DEAD box RNA helicases (RH3 and RH33) were oppositely regulated in response to 40 Gy.

Respiratory energy metabolism was also affected by IR. Cellular respiration is targeted during the regulation of environmental stress [25]. Here, the 40 Gy treatment had a greater effect on the proteins of this pathway than did the 10 Gy treatment. The lower dose led to a single strong reduction of the glycolytic 2,3-biphosphoglycerate mutase, an enzyme that acts as a regulator in glycolysis (Rapoport-Luebering shunt). After 40 Gy exposure, three glycolytic enzymes were enhanced, and the TCA-cycle enzyme IDH1 varied significantly (see Results Section 3.3). The strong increase in IDH1 levels at 24 h could significantly aid IR defences. IDH1 is an essential sustainer of reducing equivalents (NAD(P)H) for antioxidant systems in irradiated *Escherichia coli* [33].

Adjustments of both photosynthesis and respiration require the correct functioning of organelles, the sites of essential reactions, during stress. Consequently, it was not surprising that IR treatments led to increases in protecting chaperones, such as those observed in leaves. The mitochondrial Hsp60 was induced by both doses, and the stromal Hsp70-2, which is involved in photosystem maintenance under stress conditions in *Chlamydomonas* [34], accumulated after the 40 Gy dose. In contrast, some chaperones (hsc70,

CPN20 and Hsp60) were down-regulated in roots, which were morphologically more affected by IR.

In amino acid pathways (Fig. 4), the 40 Gy dose increased GDC-T and SHM1, which are reported to be targets of S-nitrosylation [35], suggesting the involvement of the mitochondrial photorespiratory system in the ROS-mediated signal transduction for oxidative stress. Despite its role in the antioxidative glutathione-ascorbate cycle, the observed decrease in glutathione biosynthetic enzymes after the 40 Gy treatment is likely due to the use of glutamate for glutamine production in the chloroplast, possibly to fix ammonia produced from SHM1 [36]. The increase in GS2 after the 40 Gy exposure supports a non-senescence-like response in the plants, as it would be degraded for nitrogen remobilisation [37].

In addition to adaptations in metabolism, we evaluated the up-regulation of antioxidative defences in irradiated plants, as their enhancement is often reported in the event of abiotic stress. Different antioxidative systems were involved in the response to the 10 and 40 Gy doses: the 10 Gy dose led to an increase in proteins that participate in antioxidative metabolite pathways, while the 40 Gy dose induced the more classical ROS-scavenging enzymes. The GLSs hydrolysis pathway, which was up-regulated after 10 Gy exposure, is known to be a response to attack by pests, especially when it emphasises ITC production [38]. But like some other secondary organosulphur compounds, ITCs may possess antioxidative capacity by inhibiting ROS-mediated lipid peroxidation, scavenging free radicals or enhancing antioxidative activities [39,40]. A radioprotective effect for ITCs has been reported in mice [41]. In contrast, the 40 Gy treatment immediately up-regulated some antioxidant enzymes (see Results Section 3.3). Given these differing responses, we hypothesise that the level of the redox imbalance provoked by IR could determine the choice between enzymatic or metabolite-dependent ROS defences. Thus, the high redox imbalance provoked by 40 Gy increased enzymes of enzymatic ROS defences and reduced those of metabolite-dependent ones, while the opposite was true for the mild redox imbalance provoked by 10 Gy.

Acclimation of plants to environmental stress often involves kinase transduction mechanisms. Although no kinases appeared in our dataset, they are often under-represented in proteomics data (due to their low abundances and the limits of detection). However, the levels of kinase-interacting partners were affected. The increase in the level of RACK1A expression after both doses in the aerial parts, which did not exhibit any weight change after IR exposure, and its repression in roots at 40 Gy suggested that it could be involved in the observed inhibition of root growth. RACK1 proteins are versatile scaffolding/anchoring proteins that bind a variety of signalling proteins ranging from kinases, phosphatases, ion channels, membrane receptors and G proteins. In *Arabidopsis*, RACK1A is an integrative point for diverse developmental and environmental stress signal transduction pathways [42], and it may also act as a translation regulator due to its association with cytosolic ribosomes [43,44]. The decrease in RACK1B and RACK1C expression after the 10 Gy dose may be part of a finer regulation, as RACK1A can almost completely replace RACK1B or RACK1C function [43]. In this context, the emb1796 protein could also be involved in root growth inhibition because it was the most down-regulated protein in roots after the 40 Gy dose.

The emb1796 has been reported to interact with the CDC2 protein (Cell division control 2), a cyclin-dependent protein kinase [45].

## 5. Conclusions

Comparative proteomics using 2-DE was used to analyse the global cellular response to radiation exposure. As 10 and 40 Gy IR exposures led to differential physiological and proteomic responses, IR is a good model to study the role of increasing redox imbalance in stress responses. In addition to the different metabolic effects, our results suggest the existence of a redox-regulated choice between a metabolic defence response (GLSs hydrolysis) or classical ROS-scavenging enzymatic systems. The proteomic analysis also provided insight into the role of post-transcriptional and post-translational regulation mechanisms in the photosynthetic adaptation to oxidative stress and implicated the involvement of the RACK1 family of proteins in the signalling cascade after IR exposure. Analysing the two plant tissues at different times after irradiation was important for the successful analysis of the acute proteomic response to both IR doses. However, improvements in the technical reproducibility and accuracy of the 2-DE and MS/MS analyses will be needed to completely explain the dynamic response to IR. The results presented here should focus further investigations on a select group of proteins.

Supplementary materials related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.jprot.2011.03.025](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.025).

## Acknowledgments

This work has been supported by a Short Term Scientific Mission (STSM) grant from the EU COST action FA0603 “Plant Proteomics in Europe”. M.G. was supported by an “ARED Elodie” fellowship from the Région Bretagne (France). The authors thank Dr. Consuelo Gómez Díaz for handling the project at the UCO-SCAI (University of Cordoba).

## REFERENCES

- [1] Tubiana M, Averbek D, Bourguignon M, Bourthis J, Cassiman J-J, Cosset J-M, Favaudon V, Gardès-Albert M, Girinski T, Gourmelon P, Helfre S, Lartigau E, Masse R, Wambersie A. Chapitre II: Chimie sous rayonnement. Hermann Editors. RADIOBIOLOGIE: Radiothérapie et radioprotection—bases fondamentales. Paris: Hermann/Médecine; 2008. p. 41–70.
- [2] De Micco V, Arena C, Pignalosa D, Durante M. Effects of sparsely and densely ionising radiation on plants. *Radiat Environ Biophys* 2010; [doi:10.1007/s00411-010-0343-8](https://doi.org/10.1007/s00411-010-0343-8) published online.
- [3] Zaka R, Chenal C, Misset MT. Effects of low doses of short-term gamma irradiation on growth and development through two generations of *Pisum sativum*. *Sci Total Environ* 2004;320:121–9.
- [4] Kurimoto T, Constable JV, Huda A. Effects of ionizing radiation exposure on *Arabidopsis thaliana*. *Health Phys* 2010;99(1):49–57.
- [5] Vandenhove H, Vanhoudt N, Cuypers A, Van Hees M, Wannijn J, Horemans N. Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways. *Plant Physiol Biochem* 2010;48:778–86.
- [6] Esnault MA, Legué F, Chenal C. Ionizing radiation: advances in plant response. *Environ Exp Bot* 2010;68:231–7.
- [7] Dixit AK, Bhatnagar D, Kumar V, Rani A, Manjaya JG, Bhatnagar D. Gamma irradiation induced enhancement in isoflavones, total phenol, anthocyanin and antioxidant properties of varying seed coat colored soybean. *J Agric Food Chem* 2010;58:4298–302.
- [8] Nagata T, Yamada H, Du Z, Todoriki S, Kikuchi S. Microarray analysis of genes that respond to  $\gamma$ -irradiation in *Arabidopsis*. *J Agric Food Chem* 2005;53:1022–30.
- [9] Hung CD, Johnson K. Effects of ionising radiation on the growth and allyl isothiocyanate accumulation of *Wasabia japonica* in vitro and ex vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2008;44:51–8.
- [10] Vanhoudt N, Vandenhove H, Horemans N, Wannijn J, Van Hees M, Vangronsveld J, Cuypers A. The combined effect of uranium and gamma radiation on biological responses and oxidative stress induced in *Arabidopsis thaliana*. *J Environ Radioact* 2010;101:921–30.
- [11] Wi SG, Chung BY, Kim JS, Kim JH, Baek MH, Lee JW, Kim YS. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron* 2007;38:553–64.
- [12] Kim J-H, Chung BY, Kim J-S, Wi SG. Effects of in planta gamma-irradiation on growth, photosynthesis, and antioxidative capacity of red pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *J Plant Biol* 2005;48:47–56.
- [13] Kovalchuk I, Molinier J, Yao Y, Arkhipov A, Kovalchuk O. Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation. *Mutat Res* 2007;624:101–13.
- [14] Kim J-H, Moon YR, Kim J-S, Oh M-H, Lee J-W, Chung BY. Transcriptomic profile of *Arabidopsis* rosette leaves during the reproductive stage after exposure to ionising radiation. *Radiat Res* 2007;168:267–80.
- [15] Danchenko M, Skultety L, Rashydov NM, Berezhna VV, Matel L, Salaj T, Pret'ova A, Hajduch M. Proteomic analysis of mature soybean seeds from the Chernobyl area suggests plant adaptation to the contaminated environment. *J Proteome Res* 2009;8:2915–22.
- [16] Klubicová K, Danchenko M, Skultety L, Miernyk JA, Rashydov NM, Berezhna VV, Pret'ová A, Hajduch M. Proteomics analysis of flax grown in Chernobyl area suggests limited effect of contaminated environment on seed proteome. *Environ Sci Technol* 2010;44(18):6940–6.
- [17] Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 2001;13:1499–510.
- [18] Wang W, Vignani R, Scali M, Cresti MA. Universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* 2006;27:2782–6.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [20] Maldonado AM, Echevarria-Zomeño S, Jean-Baptiste S, Hernandez M, Jorin-Novo JV. Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *J Proteomics* 2008;71:461–72.
- [21] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B Stat Methodol* 1995;57:289–300.
- [22] Gorecka KM, Konopka-Postuplska D, Hennig J, Buchet R, Pikula S. Peroxidase activity of annexin 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;336:868–75.
- [23] Nagano AJ, Fukao Y, Fujiwara M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. Antagonistic jacalin-related lectins

- regulate the size of ER body-type  $\beta$ -glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2008;49:969–80.
- [24] Sun X, Fu T, Chen N, Guo J, Ma J, Zou M, Lu C, Zhang L. The stromal chloroplast Deg7 protease participates of the repair of photosystem II after photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2010;152:1263–73.
- [25] Taylor NL, Tan YF, Jacoby RP, Millar AH. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *J Proteomics* 2009;72:367–78.
- [26] Vasileuskaya Z, Oster U, Beck CF. Involvement of tetrapyrroles in inter-organellar signalling in plants and algae. *Photosynth Res* 2004;82:289–99.
- [27] Salvucci ME. Association of Rubisco activase with chaperonin-60 $\beta$ : a possible mechanism for protecting photosynthesis during heat stress. *J Exp Bot* 2008;59:1923–33.
- [28] Sjögren LLE, Stanne TM, Zheng B, Sutinen S, Clarke AK. Structural and functional insights into the chloroplast ATP-dependent Clp protease in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006;18:2635–49.
- [29] Zybailov B, Friso G, Kim J, Rudella A, Ramirez Rodriguez V, Asakura Y, Sun Q, Van Wilk KJ. Large scale comparative proteomics of a chloroplast Clp protease mutant reveals folding stress, altered protein homeostasis, and feedback regulation of metabolism. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:1789–810.
- [30] Sjögren LLE, MacDonald TM, Sutinen S, Clarke AK. Inactivation of the clpC1 gene encoding a chloroplast Hsp100 molecular chaperone causes growth retardation, leaf chlorosis, lower photosynthetic activity and a specific reduction in photosystem content. *Plant Physiol* 2004;136:4114–26.
- [31] Bollenbach TJ, Sharwood RE, Gutierrez R, Mache SL, Stern DB. The RNA-binding proteins CSP41a and CSP 41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 2009;69:541–52.
- [32] Bindschedler LV, Palmblad M, Cramer R. Hydroponic isotop labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics; an oxidative stress case study. *Phytochemistry* 2008;69:1962–72.
- [33] Lee SM, Koh HJ, Huh TL, Park JW. Radiation sensitivity of an *Escherichia coli* mutant lacking NADP<sup>+</sup>-dependant isocitrate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:647–50.
- [34] Su PH, Li HM. *Arabidopsis* stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiol* 2008;146:1231–41.
- [35] Palmieri MC, Lindermayr C, Bauwe H, Steinhauser C, Durner J. Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation. *Plant Physiol* 2010;152:1514–28.
- [36] Linka M, Weber APM. Shuffling ammonia between mitochondria and plastids during photorespiration. *Trends Plant Sci* 2005;10(10):461–5.
- [37] Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M. Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biol* 2008;10:23–36.
- [38] Mewis I, Tokuhisa JG, Schultz JC, Appel HM, Ulrichs C, Gershenzon J. Gene expression and glucosinolate accumulation in *Arabidopsis thaliana* in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathway. *Phytochemistry* 2006;67:2450–62.
- [39] Shukla Y, Taneja P. Antimutagenic effects of garlic extract on chromosomal aberrations. *Cancer Lett* 2002;176:31–6.
- [40] Kim JM, Chang HJ, Kim WK, Chang N, Chun HS. Structure-activity relationship of neuroprotective and reactive oxygen species scavenging activities for allium organosulfur compounds. *J Agric Food Chem* 2006;54:6547–53.
- [41] Chittetzath M, Kuttan G. Radioprotective activity of naturally occurring organosulfur compounds. *Tumori* 2006;92:163–9.
- [42] Chen JG, Hemayet U, Temple B, Liang J, Guo J, Alonso JM, Ecker JR, Jones AM. RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2006;57:2697–708.
- [43] Guo J, Wang S, Wang J, Huang WD, Liang J, Chen J-G. Dissection of the relationship between RACK1 and heterodimeric G-proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2009;50:1681–94.
- [44] Guo J, Wang J, Xi L, Huang WD, Liang J, Chen J-G. RACK1 is a negative regulator of ABA responses in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2009;60:3819–33.
- [45] Van Leene J, Stals H, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Van Isterdael G, De Clercq A, Bonnet E, Laukens K, Remmerie N, Henderickx K, De Vijlder T, Abdelkrim A, Pharazyn A, Van Onckelen H, Inzé D, Witters E, De Jaeger G. A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1226–38.

## 2.4. Conclusion

A travers cette étude, les radiations se révèlent un bon modèle pour étudier le rôle joué par le déséquilibre redox croissant dans la réponse au stress. Les doses 10 Gy et 40 Gy se sont révélées pertinentes et ont clairement conduit à des réponses moléculaires différentes. Elles provoquent une baisse quasi équivalente du métabolisme basal (les protéines intervenant dans le métabolisme primaire représentent respectivement 39% et 36% des sous-expressions après 10 Gy et 40 Gy), signe de la réorientation des ressources de la plante pour lutter contre le stress subi. Cependant, après 40 Gy, 62% de ces sous-expressions du métabolisme primaire ont lieu dès 2h après irradiation (contre 25% 2h après 10 Gy) indiquant une réaction beaucoup plus rapide face à cette intensité de stress. L'article publié détaille les changements relatifs des quantités de protéines après les réponses aux deux doses d'irradiation et met en avant les principales voies métaboliques altérées.

Les résultats suggèrent l'existence d'un choix de la « méthode de lutte » dépendant de l'intensité du déséquilibre redox induit dans la cellule, par exemple entre une lutte par production de métabolites secondaires potentiellement antioxydante (hydrolyse des GLSs) ou par le système enzymatique classique d'élimination des ROS. D'autre part, ils montrent également une adaptation du métabolisme énergétique, notamment de la photosynthèse, qui semble stimulée par la dose 10 Gy et plutôt inhibée par la dose 40 Gy. Les changements en protéines thylakoïdales pourraient alors être dus à une régulation post-traductionnel impliquant le complexe protéolytique ClpPRS (Figure 21). Par ailleurs, la protéine Clp RNA-binding protein CSP41B pourrait jouer un rôle dans la régulation des enzymes impliquées dans la photosynthèse et la photorespiration qui a lieu après 40 Gy. En effet, on observe une accumulation immédiate de cette protéine qui stimule la transcription et la traduction chloroplastique (Bollenbach *et al.* 2009), de façon concomittente à celles de la glyceraldehyde-3-P deshydrogenase C-2, de la fructose-bisphosphate aldolase SFBA-2, de la glutamine synthetase chloroplastique GS2, de la phosphoribulokinase PRK, de la rubisco activase RCA et de l'aminomethyltransferase GDC-T. Sa transcription est également co-exprimée avec de nombreux gènes relatifs au cycle de Calvin et à la photorespiration dans plus de mille études par puce à ADN chez *A. thaliana* (Tableau 7). Elle interagit d'autre part physiquement avec deux nucléoporines et deux transducines (Tamura *et al.* 2010).

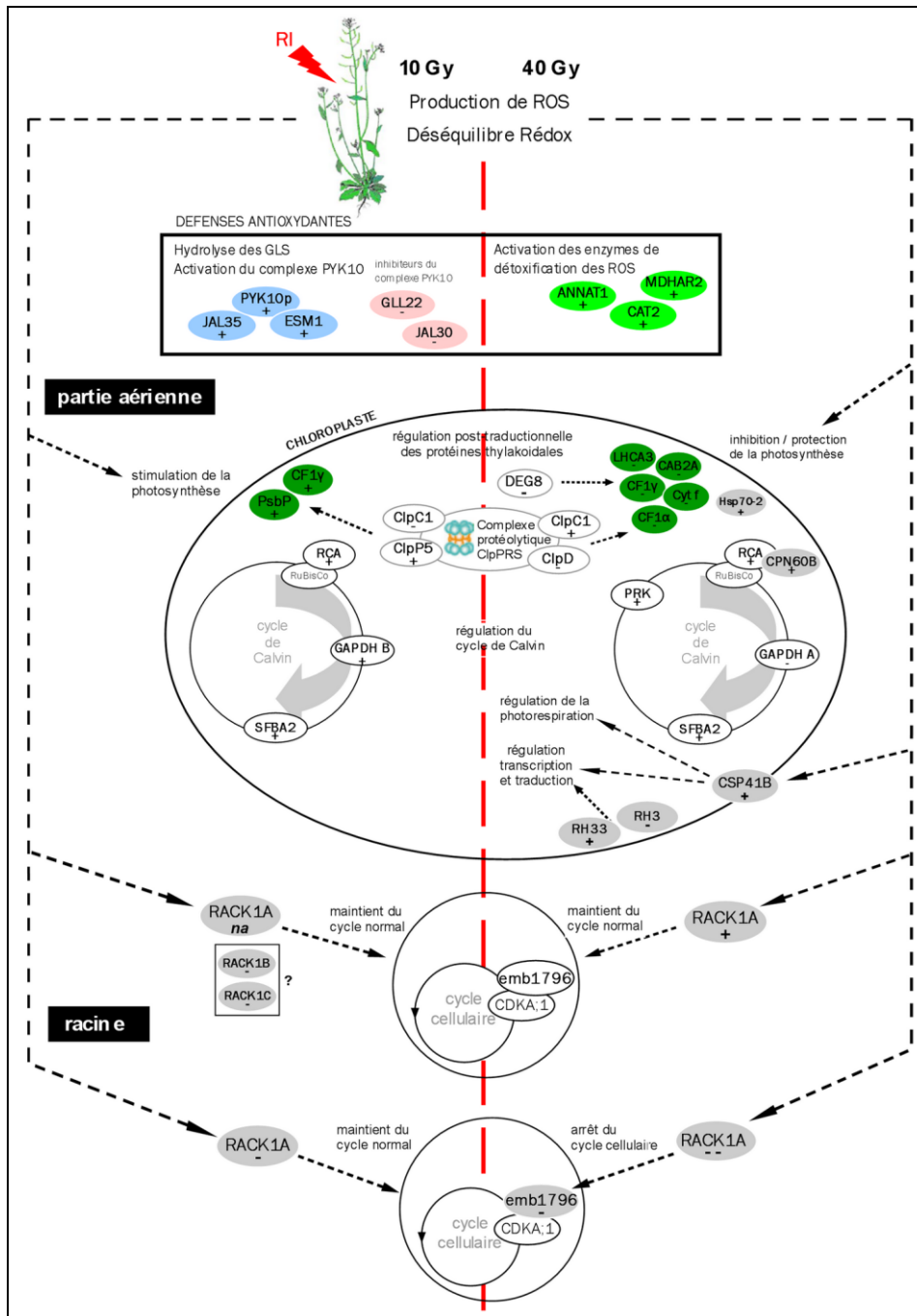


Figure 21 – Schéma récapitulatif des régulations du protéome observées après des irradiations de 10 Gy et 40 Gy chez *A. thaliana*. ANNAT1 : Annexin ANNAT1 ; CAT2 : Peroxisomal catalase 2 ; MDHAR2 : Monodehydroascorbate reductase 2 ; PYK10p :  $\beta$ -Glucosidase PYK10 3D precursor ; JAL35 : Myrosinase binding protein JAL35/JR1 ; ESM1 : Epithiospecifier modifier GLL65/ESM1 ; GLL22 : Myrosinase-associated protein GLL22 ; JAL30 : PYK10 binding protein JAL30/PBP1 ; PsbP : PsbP protein (PSII) ; CF1 $\gamma$  : Clp ATP synthase CF1 ( $\gamma$  subunit) ; CAB2A : CAB2A protein ; LHCA3 : PSI protein LHCA3 ; CF1 $\alpha$  : Clp ATP synthase CF1 ( $\alpha$  subunit) ; Cyt f : Cytochrome f apoprotein ; ClpC1 : Clp protease subunit CLPC1 ; ClpD : ClpD protease ERD1 ; ClpP5 : Clp protease ClpP5 ; DEG8 : DEG8 protease ; RCA : Rubisco activase RCA ; GAPDH B : Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase B ; GAPDH A : Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase A ; SFBA2 : Fructose bisphosphate aldolase 2 ; PRK : Phosphoribulokinase PRK ; CPN60B : Chaperonin CPN60B ; Hsp70-2 : Clp Hsp 70-2 ; CSP41B : Clp RNA-binding protein CSP41B ; RH3 : Clp DEAD box RNA helicase RH3 ; RH33 : Clp DEAD box RNA helicase At2g07750 ; RACK1A : Receptor for activated C kinase RACK1A ; RACK1B : Receptor for activated C kinase RACK1B ; RACK1C : Receptor for activated C kinase RACK1C ; CDKA;1 : Cyclin-dependent protein kinase CDKA;1 (synonyme : Cdc2) ; na : non affectée.

Enfin, trois protéines de la famille des récepteurs kinase RACK1 subissent des changements d'expression après irradiation et sont de possibles acteurs de la cascade de signalisation menant à l'arrêt de croissance observé dans les racines après la dose 40 Gy. RACK1A, qui subit une régulation différentielle dans les parties aériennes et dans les racines après 40 Gy, interagit avec les protéines G AGG1 et AGG2 (Olejnik *et al.* 2011) et interagirait également avec d'autres transducines et des protéines régulant le cycle cellulaire (Tableau 7). Elle pourrait aussi interagir avec RACK1B et RACK1C qui sont sous-exprimées dans les parties aériennes après 10 Gy et sont également susceptibles d'être partenaires de transducines et de protéines impliquées dans le développement. RACK1A pourrait par exemple agir sur l'association de la protéine emb1796, protéine la plus sous-exprimée dans les racines après 40 Gy, avec la cyclin-dependent protein kinase CDKA;1 qui régit le cycle cellulaire (Van Leene *et al.* 2010). D'autre part, emb1796 est l'homologue de la protéine nucléaire GRP23 de la levure qui interagit physiquement avec l'ARN polymérase II dans les cellules de levure et de plantes, suggérant un rôle supplémentaire de cette protéine comme régulateur de la transcription qui pourrait notamment être essentiel dans l'embryogénèse précoce chez *A. thaliana* (Ding *et al.* 2006). Ainsi, le rôle des gènes CSP41B, RACK1A, RACK1B et RACK1C dans la réponse aux RI mériterait d'être approfondi par une étude transcriptomique comparative entre les mutants existants de ces gènes et le type sauvage d'*A. thaliana*.

**Tableau 7 – Récapitulatif des interactions, réelles et prédites, et des co-expressions données pour les protéines RACK1A, RACK1B, RACK1C, CSP41B et emb1796 (cf M&M – 12.) . emb : embryo defective ; clp : chloroplastique ; mt : mitochondrial ; prsm : peroxisomal ; dpdt : dependent.**

<b>agi</b>	<b>nom</b>	<b>Interactions</b>
AT1G18080	RACK1A	<p><b>Prédiction in Silico</b>            AT1G48630 RACK1B            AT3G18130 RACK1C            AT2G39460 Ribosomal protein ATRPL23A            AT2G26060 emb1345            AT1G21690 emb1968, replication factor RFC4            AT1G47220 cyclin-dependent protein kinase CYCLIN A3;3            AT3G49660 transducin / WD-40 repeat family            AT1G04510 transducin / WD-40 repeat family            AT4G02730 transducin / WD-40 repeat family            AT5G27790 protein kinase family protein</p>
		<p>AT1G35330 zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein            AT1G60360 zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein            AT1G04730 AAA-type ATPase family protein            AT1G56110 homolog of nucleolar protein NOP56            AT5G43380 type one serine/threonine protein phosphatase TOPP6            AT1G34065 S-adenosylmethionine carrier SAMC2            AT3G05155 sugar transporter, putative</p> <p><b>Démontrées expérimentalement</b>            AT4G12720 ATNUDT7 (Olejnik <i>et al.</i> 2011)            AT3G63420 G protein <math>\gamma</math>-subunit AGG1 (Olejnik <i>et al.</i> 2011)            AT3G22942 G protein <math>\gamma</math>-subunit AGG2 (Olejnik <i>et al.</i> 2011)</p>
AT1G48630	RACK1B	<p><b>Prédiction in Silico</b>            AT3G18130 RACK1C            AT2G26060 emb1345; nucleotide binding            AT4G02730 transducin / WD-40 repeat family            AT3G49660 transducin / WD-40 repeat family            AT1G59960 aldo/keto reductase, putative            AT3G59480 pfkB-type carbohydrate kinase family protein            AT1G07030 mitochondrial substrate carrier family protein</p>
		<p>AT4G27800 protein phosphatase PP2C PPH1            AT4G32950 protein phosphatase PP2C, putative            AT5G48180 kelch repeat-containing protein            AT3G06060 short-chain dehydrogenase/reductase SDR family protein            AT1G21780 BTB/POZ domain-containing protein            AT4G38460 geranylgeranyl pyrophosphate synthase small subunit</p>
AT3G18130	RACK1C	<p><b>Prédiction in Silico</b>            AT1G18080 RACK1A            AT1G48630 RACK1B            AT2G26060 emb1345            AT3G49660 transducin / WD-40 repeat family            AT4G02730 transducin / WD-40 repeat family            AT1G59960 aldo/keto reductase, putative            AT3G59480 pfkB-type carbohydrate kinase family protein</p>
		<p>AT4G27800 protein phosphatase PP2C PPH1            AT1G07030 mitochondrial substrate carrier family protein            AT3G06060 short-chain dehydrogenase/reductase SDR family protein            AT4G32950 protein phosphatase PP2C, putative            AT5G48180 kelch repeat-containing protein            AT1G21780 BTB/POZ domain-containing protein            AT4G38460 geranylgeranyl pyrophosphate synthase small subunit</p>
AT1G09340	CSP41B	<p><b>Démontrées expérimentalement</b>            AT3G10650 nucleoporin (Tamura <i>et al.</i> 2010)            AT2G41620 uncharacterized protein (Tamura <i>et al.</i> 2010)</p>
		<p>AT3G63140 clp protein CSP41A (Bollenbach <i>et al.</i> 2009)            AT4G30840 transducin / WD-40 repeat family (Tamura <i>et al.</i> 2010)            AT1G80670 transducin / WD-40 repeat family (Tamura <i>et al.</i> 2010)</p>
AT3G49240	emb1796	<p><b>Prédiction in Silico</b>            AT1G63150 pentatricopeptide repeat-containing protein            AT4G03490 protein binding</p>
		<p><b>Démontrées expérimentalement</b>            AT3G48750 CDKA;1 (Van leene 2010)            AT1G20590 cyclin, putative (Van leene 2010)</p>



### 3. Effets des radiations ionisantes sur le transcriptome d'*A. thaliana*

#### 3.1. Introduction

La réponse à des conditions de stress oxydant et génotoxicité telle que l'exposition aux radiations ionisantes implique une régulation du métabolisme des plantes simultanément au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. En conséquence, le transcriptome et le protéome mettent rarement en jeu les mêmes gènes (Gygi *et al.* 1999, Olivares-Hernandez *et al.* 2011). L'étude de l'effet des RI sur le protéome d'*A. thaliana* (cf Chapitre 1 – 2.) a donc logiquement été complétée par une approche du transcriptome dans des conditions analogues afin d'élucider les mécanismes de régulation qui ont lieu en amont. Cette analyse du transcriptome a été réalisée par puce à ADN CATMA, en collaboration avec le département de l'URGV de l'INRA d'Evry. Les résultats sont présentés et analysés dans l'article « Kinetic transcriptomic approach revealed metabolic pathways and genotoxic-related changes implied in the Arabidopsis response to ionising radiations » présenté à suivre<sup>4</sup>. A ce jour, quatre études globales du transcriptome ont été conduites par puces à ADN sur *A. thaliana* après irradiation. Le travail de Kovalchuk *et al.* (2007) étudie le transcriptome 2 et 24 h après une irradiation à la faible dose de 1 Gy, et le compare avec celui obtenu après une irradiation chronique de même intensité. Une étude, s'intéressant également aux réponses à temps courts (2 et 24 h), décrit les effets de la très forte dose 2 kGy sur des plantules d'*A. thaliana* (Nagata *et al.* 2005). Les deux études restantes concernent la régulation du transcriptome après des irradiations d'intensités intermédiaires, l'une s'intéressant aux effets à long termes (de 3 à 16 jours) d'une dose de 200 Gy appliquée sur des plantes au stade « floraison » (Kim *et al.* 2007), et l'autre aux effets observés 1,5 h après une dose de 100 Gy sur des plantules au stade 1.0 (Culligan *et al.* 2006). Cette dernière étude est la plus proche de la nôtre du point de vue des conditions d'expérimentation. Nous avons utilisé les doses 10 Gy et 40 Gy comme pour l'étude du protéome et nous avons ajouté un point de cinétique plus tardif afin de comparer la réponse immédiate et la réponse à moyen terme. Ainsi, les analyses ont été réalisées à 2 et 26 h (le deuxième temps correspondant à 2 h + 24 h, afin d'écartier les interférences avec la régulation des gènes qui suivent un rythme circadien).

---

<sup>4</sup> Gicquel M, Taconnat L, Renou J-P, Esnault MA, Cabello-Hurtado F. Plant sci. 2012 - accepté avec modifications le 17/06/2012 - référence PSL-D-12-00320R1.

### 3.2. Résumé

Les analyses transcriptomiques des plantules d'*A. thaliana* exposées à deux doses d'irradiation modérées de 10 Gy et 40 Gy ont été réalisées 2 et 26 h après traitement à l'aide de puces microarray CATMA. Les résultats ont révélé un total de 784 gènes régulés. Sur les 343 sur-expressions qui ont lieu à 2 h, 12% sont 10 Gy-spécifiques et 78% sont 40 Gy-spécifiques. Seulement 10% sont communes aux deux doses, environ la moitié ayant une fonction connue, et parmi elles, 7 concernant des gènes liés au cycle cellulaire ou à la réparation de l'ADN et montrant des amplitudes importantes (2,9 « fold-change » minimum) après la dose 40 Gy. Simultanément, les sous-expressions correspondent à 73 gènes en commun (31%) dont seule la moitié ont une fonction connue (10 « métabolisme », 1 « énergie », 5 « développement végétal », 7 « destinée protéique synthèse et régulation », 6 « réponse au stress », 7 « transcription »). Concernant la réponse à 26 h, 16% des sur-expressions sont communes aux deux doses (le reste étant équitablement partagé entre les 10 Gy et les 40 Gy spécifiques) et 25% des sous-expressions sont également communes.

L'intensité du stress semble orienter les défenses de la plante soit vers des mécanismes métaboliques, soit vers la voie enzymatique plus classique d'élimination des ROS. En effet, la transcription de gènes de la voie des flavonoïdes et des GLSs aliphatiques a été observée après l'exposition à la dose 10 Gy, ainsi que quelques gènes relatifs à l'hydrolyse des GLSs. De l'autre côté, la dose 40 Gy a conduit à une activation de gènes d'enzyme de détoxification plus universels, comme les glutathion-S-transférases, les peroxydases ou les UDP-glucosyl transférases. Dans le même temps, la sur-expression d'un nombre important d'ARN codant pour des « heat shock protein » (HSPs) ou des chaperones est observée. La surexpression de transcripts de HSPs et de gènes de stress est également remarquée après 10 Gy dans la réponse plus tardive.

Concernant la photosynthèse, la dose 10 Gy a provoqué la sur-expression d'ARN de nombreux constituants des photosystèmes ainsi que de la déshydrogénase NAD(P)H chloroplastique. Ces catégories de gènes sont au contraire réprimées par la dose 40 Gy ce qui pourrait être lié à une diminution du fonctionnement du chloroplaste correspondant à une limitation possible de la production de ROS au niveau de cet organelle ou à un début de phénomène de sénescence. En effet, certains gènes reliés à la remobilisation des nutriments (protéines de réserve, catabolisme, transport et séquestration des lipides) ont également été surexprimés après 40 Gy.

La comparaison de ces résultats avec ceux de l'étude protéomique précédente, conduite dans les mêmes conditions expérimentales, montre peu de correspondance "gène à gène" mais les principales voies métaboliques sont régulées de la même manière. Nos données ont montré d'autre part une très bonne correspondance avec les autres études transcriptomiques menées sur *A. thaliana* après irradiation, notamment celle de Culligan *et al.* 2006, et l'aspect cinétique de notre approche apporte des informations supplémentaire sur l'évolution de la réponse dans le temps.

**3.3. Article : « *Kinetic transcriptomic approach revealed metabolic pathways and genotoxic-related changes implied in the Arabidopsis response to ionising radiations* »**





## Kinetic transcriptomic approach revealed metabolic pathways and genotoxic-related changes implied in the *Arabidopsis* response to ionising radiations

Morgane Gicquel<sup>a</sup>, Ludivine Taconnat<sup>b</sup>, Jean-Pierre Renou<sup>b,1</sup>, Marie-Andrée Esnault<sup>a</sup>, Francisco Cabello-Hurtado<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Mechanisms and Origin of Biodiversity Team, UMR 6553-Ecobio, University of Rennes1, 263 Av. du Général Leclerc, Campus de Beaulieu-Bât.14A, 35042 Rennes, France*

<sup>b</sup> *Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV), UMR INRA 1165-CNRS 8114-UEVE, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry Cedex, France*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 May 2012

Received in revised form 21 June 2012

Accepted 25 June 2012

Available online 1 July 2012

#### Keywords:

*Arabidopsis thaliana*

Microarray

Ionising radiation

DNA-checkpoint

Oxidative stress

PCD

### ABSTRACT

Plants exposed to ionising radiation (IR) have to face direct and indirect (oxidative stress) deleterious effects whose intensity depends on the dose applied and led to differential genome regulation. Transcriptomic analyses were conducted with CATMA microarray technology on *Arabidopsis thaliana* plantlets, 2 and 26 h after exposure to the IR doses 10 Gy and 40 Gy. 10 Gy treatment seemed to enhance antioxidative compound biosynthetic pathways whereas the 40 Gy dose up-regulated ROS-scavenging enzyme genes. Transcriptomic data also highlighted a differential regulation of chloroplast constituent genes depending on the IR dose, 10 Gy stimulating and 40 Gy down-regulating. This probable 40 Gy decrease of photosynthesis could help for the limitation of ROS production and may be coupled with programmed cell death (PCD)/senescence phenomena. Comparisons with previous transcriptomic studies on plants exposed to a 100 Gy dose revealed 60 dose-dependent up-regulated genes, including notably cell cycle checkpoints to allow DNA repairing phenomena. Furthermore, the alteration of some cellular structure related gene expression corroborated a probable mitotic arrest after 40 Gy. Finally, numerous heat-shock protein and chaperonin genes, known to protect proteins against stress-dependent dysfunction, were up-regulated after IR exposure.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Radiation from natural sources has always been present on earth in the form of, for instances, radioactivity in the ground and then in food, as well as cosmic rays from outer space. To this, we have nowadays to add a man-made component of radiation that is being continuously introduced to the natural background level from many sources (including nuclear power plants, nuclear accidents, fallout of nuclear weapons testing, mining of radioactive ores, research and medical procedures and wastes, etc.). Ionising radiations (IR) are known to have deleterious effects on organism health. Indeed they cause direct damages on biomolecules, and the radiolysis of the water leads to the instantaneous production of reactive oxygen species (ROS), notably the aggressive •OH radical [1]. High IR exposure can provoke the organism's death,

but lower non-lethal doses also have specific effects than can vary with species and exposure intensity. Therefore, levels of radiation intensity considered as low, moderate or high depend on organisms and species but also on the type of exposure, i.e. acute or chronic. The most consensual definition of a low dose is the one for which the organism react with efficient repairing and detoxifying mechanisms which allow cell balance restoring and avoid detrimental effects [2].

Because they are continuously exposed to IR in their environment, plants constitute a pertinent model to understand the adaptive responses to this particular source of oxidative stress and DNA damage. Numerous studies deal with plants which were artificially irradiated or cultivated on radioactive contaminated areas. Their growth was affected, especially root growth, and plant radiosensitivity resulted in morphological, physiological and metabolite changes [3]. On the cellular scale, IR notably causes DNA and protein degradation, and membrane lipid peroxidation [4,5]. Consequently, in order to limit IR deleterious effects plants activate mechanisms to face damage on biomolecules and oxidative stress provoked by IR exposure. For instances, increases in ROS scavenging enzyme activities and DNA repair mechanisms

\* Corresponding author. Tel.: +33 223235022; fax: +33 223235026.

E-mail address: [francisco.cabello@univ-rennes1.fr](mailto:francisco.cabello@univ-rennes1.fr) (F. Cabello-Hurtado).

<sup>1</sup> Present address: UMR Génétique et Horticulture (GenHort), INRA/Agrocampus-ouest/Université d'Angers, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucauzé Cedex, France.

are widely documented [5]. Additionally, the production of antioxidative compounds such as glucosinolates, anthocyanins, carotenoids, phenols, isoflavones or ascorbic acid has also been observed [6–9].

Functional genomics technologies at all levels of analysis are helpful to decipher regulators partners which lead to metabolism regulations and observed phenotypes. They are now routinely used to improve the knowledge on plant stresses and are particularly interesting when they are coupled with kinetic approaches [10]. Up-to-date, five global investigations at the transcriptomic level have already been carried out on *A. thaliana* response to IR. Kovalchuk's work [11] dealt with the effects of a very low dose (1 Gy) whereas Nagata's one [9] dealt with the response to a high acute dose (2 kGy). The effects of middle doses (a few hundred Gy) have also been studied, either on vegetative or flowering plants on one hand [12,13] and on younger plantlets on the other hand [14,15]. The latter studies drew particular attention to DNA repairing phenomena as an immediate and strong marker of irradiation, but they used plants at stages before leaf development and they analysed the short time response as they did not extend after the 5 h time point.

Recently, we carried out the first global analysis on the proteome of irradiated plantlets submitted to low (10 Gy) or moderate (40 Gy) doses of X-rays [16]. Here we described the results of the twin transcriptomic analysis carried through CATMA array technology on *A. thaliana* plantlets under similar experimental conditions. In the experimental frame of our work, 10 Gy was considered as a low dose as *Arabidopsis* adjusted its metabolism in an appropriate manner without showing any visible developmental phenotype, while 40 Gy was considered as "moderate" because the imbalance caused was reflected in a transiently decrease of the root growth despite perturbations did not compromise the plant survival. This transcriptomic analysis and its confrontation with the regulation of the proteome allowed a better understanding of plant response to IR and relationships between expression at both proteome and transcriptome levels. These approaches provided clues for key mechanisms of acclimation and cellular protection such as control of free radicals by enzymatic and non-enzymatic means, photosynthetic acclimation, maintenance of the structural integrity of proteins, mechanisms of DNA repair and cell cycle regulation, and PCD/senescence and recycling. Furthermore, comparisons of our results with other previous transcriptomic studies of *A. thaliana* IR response highlighted the robustness of our data.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plants culture and IR treatments

Seeds *Arabidopsis* Columbia (Col-0) ecotype were sterilized and then sowed under sterile conditions on Petri dishes (12 cm × 12 cm) containing half strength MS medium (Sigma) supplied with 0.5% sucrose and 0.8% agar. After 3 days at 4 °C in the dark, Petri dishes were transferred to a growth chamber (21 °C) under a 16 h light (115 μmol/m<sup>2</sup>/s) period per day. Plantlets were irradiated in the Petri dishes at the 1.02 developmental stage (according to [17], ≈10th day of growth) in a Hewlett-Packard Faxitron chamber which uses a tungsten anode for the production of X-rays (1.7 Gy/min). The IR doses applied were 10 or 40 Gy (IR10 and IR40) and an equivalent number of Petri dishes were kept as control (CT=0 Gy). The whole experiment was conducted two times independently. For each dose, fifty-four plants from three Petri dishes were harvested 2 and 26 h after irradiation, frozen using liquid N<sub>2</sub> and store at –80 °C.

### 2.2. Measurement of seedling growth and development

The root lengths of the plantlets were marked on the Petri dishes before irradiation and before harvest. They were then photographed and root lengths measured with ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). To determine fresh weights, three samples of six representative plants per box were weighed because the plants were too small for individual weightings. Growth rates are presented as the mean ± SEM (standard error of the mean) of three independent experiments and the significant variations between the irradiation conditions were tested using a Student *t*-test ( $\alpha = 0.05$ ; *p*-value < 0.05).

### 2.3. RNA isolation and transcriptome studies

Two independent biological replicates were produced. For each biological repetition and each point, RNA samples were obtained by pooling RNAs from fifty-four plants. Frozen samples were ground into powder in a ball-crusher. RNA extractions were performed with the RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (QIAGEN). RNA were finally eluted in 50 μL of RNase free water and precipitated with two volumes of absolute ethanol and 0.1 volume of 3 M sodium acetate (pH 5). They were stored at –20 °C. Microarray analysis was carried out at the Unité de Recherche en Génomique Végétale (Evry, France), using the CATMA arrays containing 31,776 gene-specific tags corresponding to 22,089 genes from *Arabidopsis* (Complete *Arabidopsis* Transcriptome MicroArray, <http://www.catma.org/>) [18]. Transcriptome analysis was performed on two independent biological replicates, and consisted on four comparisons: IR10-2h/CT-2h, IR40-2h/CT-2h, IR10-26h/CT-26h and IR40-26h/CT-26h. For each comparison, one technical replicate with fluorochrome reversal was performed for each biological replicate (i.e. four hybridizations per comparison). The labelling of cRNAs with Cy3-dUTP or Cy5-dUTP (Perkin-Elmer-NEN Life Science Products), the hybridization to the slides, and the scanning were performed as described in Lurin et al. [19]. Microarray data from this article were deposited at Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), accession no. GSE35942) and at CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>; Project: AU09-03\_gamma-irradiation) according to the "Minimum Information About a Microarray Experiment" standards.

### 2.4. Statistical analysis of microarray data

Experiments were designed with the statistics group of the Unité de Recherche en Génomique Végétale. For each array, the raw data comprised the logarithm of median feature pixel intensity at wavelengths 635 nm (red) and 532 nm (green) and no background was subtracted. An array-by-array normalization was performed to remove systematic biases. First, spots considered badly formed features were excluded. Then a global intensity-dependent normalization using the loess procedure (see Yang et al. [20]) was performed to correct the dye bias. Finally, for each block, the log-ratio median calculated over the values for the entire block was subtracted from each individual log-ratio value to correct print tip effects. Differential analysis was based on the log ratios averaged on the dye-swap: The technical replicates were averaged to get one log-ratio per biological replicate and these values were used to perform a paired *t*-test. A trimmed variance is calculated from spots which do not displaying extreme variance (see details in Gagnot et al. [18]). The raw *p*-values were adjusted by the Bonferroni method, which controls the Family Wise Error Rate in order to keep a strong control of the false positives in a multiple-comparison context. We considered as being differentially expressed the probes with a Bonferroni *p*-value < 0.05.

## 2.5. Analysis of microarray data

Functional categories of differentially expressed genes were adapted from the categories defined by the Munich Information Centre for Protein Sequences (MIPS) available on the Institute of Bioinformatics and Systems Biology (IBIS) of the Helmholtz Zentrum München website (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/>). Hierarchical clustering was performed on the  $\log_2$ -ratio values with the Genesis software ([21], <http://www.genome.tugraz.at>) using Pearson uncentred distance for the similarity distance and the average linkage for the hierarchical clustering linkage rule.

Over represented MIPS functional categories were obtained using the tool 'BioMaps' of the VirtualPlant1.2 website (<http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb/>). The observed frequency of functional categories in the IR regulated gene set were compared to their expected frequency in background *Arabidopsis* genome (28,196 genes) using a Fisher exact test with FDR correction. Reported over-represented categories showed a *p*-value of equal or less than the cut-off value of 0.01.

Co-expressions of genes present in our dataset were given by the PosMed website (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>) over a thousand GeneChip data in *A. thaliana*. Predicted interactions between proteins were given by the AtPID Website (*Arabidopsis thaliana* Protein Interactome Database; <http://www.megabionet.org/atpid/webfile/>).

## 3. Results

### 3.1. Plant growth under exposure to IR

The growth rates obtained between 2 and 26 h for aerial parts and roots are presented in Table 1. Even if fresh weight of plantlets seemed to decrease with the IR doses, no statistical significant

**Table 1**

Growth rates of aerial parts ( $\text{mg h}^{-1}$ ) and roots ( $\text{mm h}^{-1}$ ) of *A. thaliana* plantlets subjected to IR exposure (10 and 40 Gy), measured between 2 and 26 h after treatment.

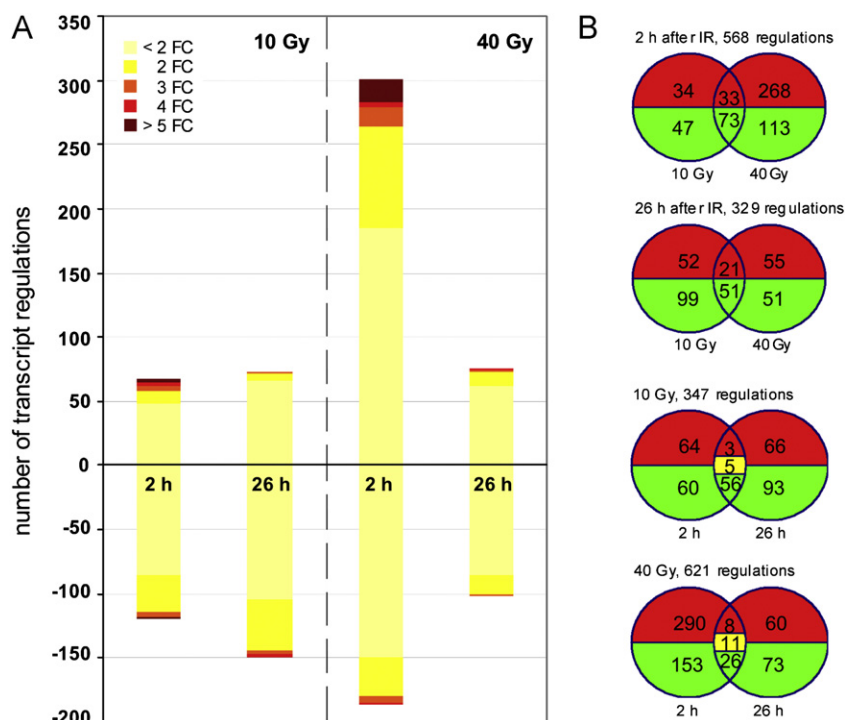
	Aerial parts ( $\text{mg h}^{-1}$ )	Roots ( $\text{mm h}^{-1}$ )
Control	0.062 ( $\pm 0.011$ )	0.263 ( $\pm 0.014$ )
10 Gy	0.056 ( $\pm 0.023$ )	0.241 ( $\pm 0.017$ )
40 Gy	0.053 ( $\pm 0.017$ )	0.207 ( $\pm 0.013$ )**

\*\* : Different from the control (Student *t*-test, ( $\alpha = 0.05$ )).

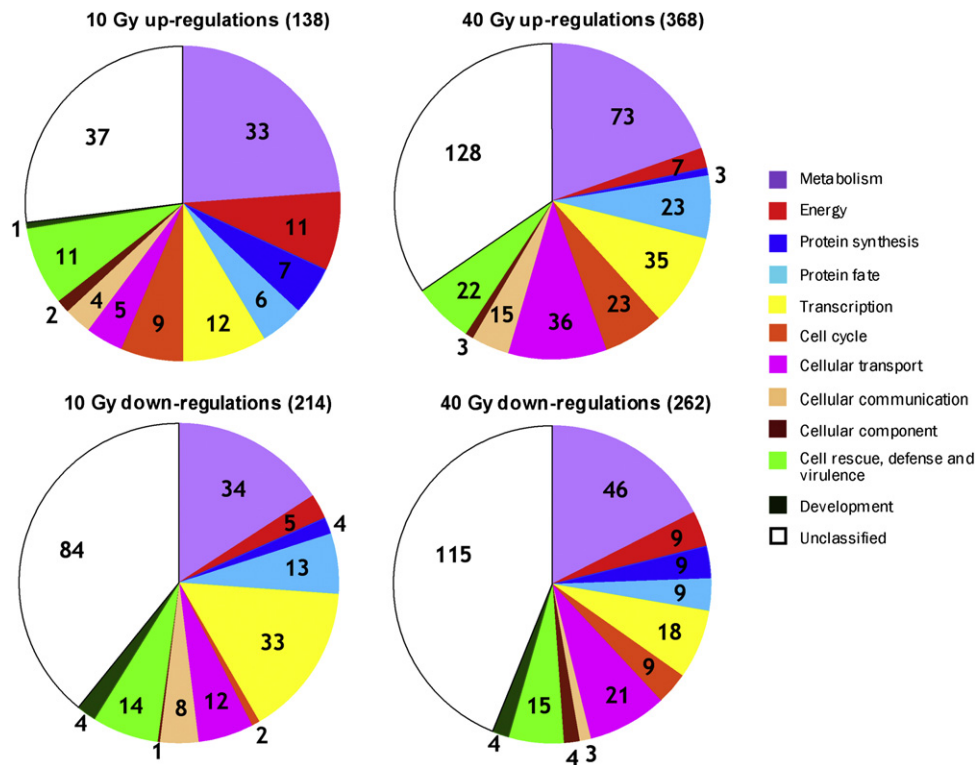
differences compared to the non-irradiated control were observed up to 26 h after IR exposure. On the other hand, roots showed to be more IR-sensitive as the 40 Gy dose led to a significant decrease (21%) of their length growth 26 h after treatment.

### 3.2. Distribution, overlap and functional classification of IR regulated transcripts

The statistical analysis revealed 784 significant variant transcripts (Supplementary data; Table S1) whose distribution (Fig. 1A) and overlaps (Fig. 1B) between the experiments revealed flagrant differences in regulations occurring after 10 Gy and 40 Gy irradiation. Thus, the transcriptome was globally more affected by the 40 Gy dose than by the 10 Gy one (621 vs. 347 gene regulations, respectively), most of this difference being due to the high number of up-regulations (301) 2 h after 40 Gy irradiation. The overall number of down-regulations was similar for both doses but presented differences over time, increasing with time for the 10 Gy dose whereas it decreases after 40 Gy (Fig. 1A). Considering gene identities, plant transcriptome under IR exposure underwent rapid and important fluctuations in time as percentages of shared regulations between 2 and 26 h were low (Fig. 1B). In addition, a higher proportion of down-regulated than up-regulated genes were shared by both doses (Fig. 1B). The functional classification of the regulated transcripts (Fig. 2) revealed a quite similar



**Fig. 1.** Distribution and overlaps of IR regulated transcripts. (A) Transcript regulations after IR treatment (10 and 40 Gy) compared to the 0 Gy control at the time points 2 and 26 h on the *A. thaliana* plantlets. Negative and positive values in the ordinate scale indicate down- and up-regulation respectively. FC = fold change. (B) Corresponding Venn diagrams: green = down-regulated transcripts; red = over-expressed transcripts; yellow = transcripts oppositely regulated at 2 and 26 h. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)



**Fig. 2.** Functional classification of the differentially expressed transcripts after IR treatments in *A. thaliana*. Adapted from the categories defined by the Munich Information Centre for Protein Sequences (MIPS – <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funccatDB/>).

representation of functional categories of genes for both IR doses, except for a 40 Gy bias towards more ‘cell transport’ up-regulated genes and more ‘cell cycle’ down-regulated genes, and a 10 Gy bias towards more ‘energy’ and ‘protein synthesis’ up-regulated genes and more ‘transcription’ and ‘cell communication’ down-regulated genes.

In order to further identify the most prominent biological processes affected by IR exposure, the functional repartition of regulated genes in our study was compared to the standard repartition in *A. thaliana* genome. This comparison revealed ‘Metabolism’, ‘Energy’, ‘Storage protein’, ‘Cell cycle and DNA processing’, ‘Cellular Transport’, ‘Cell rescue, defence and virulence’, ‘Interaction with the environment’ and ‘Systemic interaction with the environment’ as main functional categories that were differentially over-represented (Supplementary data; Table S2). Among the last three main categories, most of the over-represented sub-categories were dealing with defence and stress response.

This first bioinformatic approach was then completed by a manual detailed investigation of individual genes implied in each IR response process, namely photosynthetic acclimation, control of free radicals, preservation of protein structural integrity, mechanisms of DNA repair and cell cycle regulation, and PCD/senescence and recycling (Table 2).

### 3.3. Functional classification and clustering of highly regulated transcriptome

According to Loizeau and colleagues [22], about one third of the transcriptome regulations in response to IR can be considered as highly-responsive transcripts as their  $\log_2$ -ratio was  $\geq 1$  or  $\leq -1$ , corresponding to a 2-fold change or higher ( $|FC| \geq 2$ ). This 219 gene sub-dataset (Supplementary data; Table S3), comprised ninety-two genes which had the same behaviour (up- or down-regulation) after 10 Gy and 40 Gy for at least one time point, revealing the

important part of the common response (42%). Highly-responsive transcripts were also enriched in 40 Gy up-regulations whose number was then 5-fold higher than 10 Gy up-regulations, whereas this ratio was only of 2.8 considering the whole dataset. On the contrary, the number of down-regulations after 10 Gy or 40 Gy was much the same.

Finally, the highly-regulated genes were submitted to a hierarchical clustering in order to help us identify groups of genes which exhibit similar behaviours across IR doses and stress time course. Selected clusters as well as expression profiles and functional classification for each cluster are represented in Fig. 3 and introduced below.

#### 3.3.1. Highly down-regulations after IR

Seventy-nine transcripts were highly down-regulated after IR exposure. They were classified in three clusters in the hierarchical clustering function of their expression pattern similarity (Fig. 3, Table S3). Cluster 1 gathered seventeen transcripts which only showed significant expression decreases 2 h after irradiation treatments, and was enriched in genes involved in transmembrane transporters and cellular components, notably expansins. The fifty-six genes from cluster 2 were highly down-regulated for at least two conditions and mainly corresponded to transcription factors or protein fate related genes (31%) and primary metabolism genes (18%). Finally, cluster 3 deals with sixteen genes for the most part down-regulated 26 h after exposure to both IR doses, half of them being also up-regulated by 40 Gy at 2 h.

#### 3.3.2. Highly up-regulations after IR

The three clusters numbered 4, 5 and 6 in the hierarchical clustering (Fig. 3, Table S3) comprised 130 of the 138 IR highly up-regulated transcripts. The cluster 4 gathered fifty-five genes which were up-regulated at 2 h in a direct dose-dependent manner, and recovered the control level at 26 h. This cluster contained 24% of



**Table 2**  
Pathways and the corresponding genes implied in *A. thaliana* responses to ionising radiation exposure (10 Gy and 40 Gy). The given positive and negative values are respectively the fold up- or down-regulation compared to the control. Significant and non-significant differences are in bold and grey respectively. Cluster number (C) from hierarchical clustering of the transcriptomic analysis is indicated for highly regulated genes ( $|FC| \geq 2$ ). TAIR ID: Arabidopsis locus identifier assigned by The Arabidopsis Information Resource; clp: plastid gene;  $\ddagger$ : non available data.

TAIR ID	Name	C	10 Gy		40 Gy	
			2 h	26 h	2 h	26 h
ATCG00070	PSII protein K ( <i>psbK</i> ), clp		1.58	1.31	-1.04	1.21
ATCG00080	PSII protein I ( <i>psbI</i> ), clp		1.57	1.17	-1.05	1.01
ATCG00220	PSII protein M ( <i>psbM</i> ), clp		1.61	-1.05	1.10	1.21
ATCG00300	PSII protein Z ( <i>psbZ</i> ), clp		1.66	-1.05	1.06	-1.40
ATCG00710	PSII protein H ( <i>psbH</i> ), clp		1.69	1.11	1.17	-1.24
AT3G01440	PSII oxygen-evolving enhancer protein 3 ( <i>psbQ</i> )		1.00	1.28	-1.60	1.34
ATCG01010	NAD(P) <i>H</i> -quinone oxidoreductase subunit 5 ( <i>ndhF</i> ), clp		1.68	1.12	1.02	-1.09
ATCG01050	NAD(P) <i>H</i> -quinone oxidoreductase chain 4 ( <i>ndhD</i> ), clp	3	1.56	-1.16	1.54	-1.93
ATCG00440	NAD(P) <i>H</i> -quinone oxidoreductase subunit 3 ( <i>ndhC</i> ), clp		1.57	-1.09	1.21	1.06
ATCG00720	Cytochrome b6 ( <i>petB</i> ), clp		1.69	1.01	1.17	-1.26
ATCG00540	Apocytocrome f ( <i>petA</i> ), clp		1.64	-1.27	1.37	-1.65
ATCG00490	Rubisco large subunit ( <i>rbcL</i> ), clp		1.56	-1.11	1.06	-1.27
AT3G60750	Transketolase ( <i>TKL</i> )		-1.17	1.76	-1.83	1.61
ATI G80920	Chaperone protein DnaJ 8 ( <i>AfJ8</i> )	2	-2.24	-2.82	-1.88	-2.19
AT4G36040	Chaperone protein DnaJ 11 ( <i>AfJ11</i> )	2	-2.27	-2.34	-1.79	-1.70
ATI G75690	Protein disulfide-isomerase <i>LOX1</i>		1.47	-1.02	1.65	1.09
AT3G47470	PSI light-harvesting complex (LHC) chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 4 ( <i>Lhca4</i> )		-1.45	-1.40	-1.48	-1.59
AT2G34430	PSII type 1 LHC chlorophyll <i>a/b</i> binding protein ( <i>Lhb1B1</i> )		-1.89	-1.30	-1.75	-1.73
AT2G34420	PSII type 1 LHC chlorophyll <i>a/b</i> binding protein ( <i>Lhb1B2</i> )		-1.70	-1.46	-1.22	-1.61
AT2G05100	PSII LHC protein 2.1 ( <i>Lhcb2.1</i> )		-1.28	-1.19	-1.06	-1.66
ATI G29920	PSII LHC protein 1.1 ( <i>Lhcb1.1</i> )		-1.68	-1.55	-1.23	-1.67
Enzymatic ROS scavenging and detoxification						
AT4G36430	Peroxidase <i>Px49</i> ( <i>PER49</i> )		1.41	1.04	1.59	1.00
AT4G37530	Peroxidase <i>Px51</i> ( <i>PER51</i> )	5	1.32	-1.09	2.03	-1.04
AT5G19890	Peroxidase <i>Px59</i> ( <i>PER59</i> )		1.03	-1.58	-1.08	-1.26
AT4G37520	Peroxidase <i>Px50</i> ( <i>PER50</i> )		-1.04	-1.57	1.37	-1.17
ATI G71695	Peroxidase <i>Px12</i> ( <i>PER12</i> )		-1.13	1.39	-1.64	1.47
ATI G05260	Peroxidase <i>Px3</i> ( <i>PER3</i> )		1.07	-1.08	1.05	-1.89
AT2G37130	Peroxidase <i>Px21</i> ( <i>PER21</i> )	2	-2.03	-1.22	-1.94	-1.08
ATI G02930	Glutathione-S-transferase <i>GSTF6</i>		1.12	-1.25	1.95	1.12
AT2G47730	Glutathione-S-transferase <i>GSTF8</i>		1.14	-1.05	1.88	-1.03
ATI G78340	Glutathione-S-transferase <i>GSTU2</i>		1.19	-1.19	1.69	1.05
ATI G17170	Glutathione-S-transferase <i>GSTU24</i>		1.04	-1.03	1.99	-1.04
ATI G17180	Glutathione-S-transferase <i>GSTU25</i>	4	1.54	1.33	2.65	1.18
AT2G30140	UDP-glucosyl transferase <i>UGT87A2</i>		1.04	-1.37	1.58	-1.08
ATI G22400	UDP-glucosyl transferase <i>UGT85A1</i>		1.10	-1.07	1.67	-1.07
ATI G05680	UDP-glycosyltransferase <i>UGT74E2</i>		-1.04	1.06	1.80	1.17
AT2G15480	UDP-glycosyl transferase <i>UGT73B5</i>		1.12	-1.27	1.85	-1.09
AT2G15490	UDP-glycosyltransferase <i>UGT73B4</i>	5	1.20	-1.25	2.93	-1.15
AT4G12720	Nudix hydrolase 7 ( <i>NUD17</i> )	5	-1.01	-1.22	2.20	-1.14

Photosynthesis

Antioxidative defence

Table 2 (Continued)

10 Gy	TAIR ID		Name	C	40 Gy	
	2 h	26 h			2 h	26 h
Metabolic antioxidants						
-1.14	AT4G13770	Aliphatic GLS biosynthesis	Cytochrome P450 CYP83A1		-1.69	1.53
1.13	AT1G78370		Glutathione-S-transferase GSTU20		-1.41	1.43
-1.10	AT1G16410		Cytochrome P450 CYP79F1		-1.96	1.35
-1.15	AT3G19710		Branched chain aminotransferase BCAT4		-1.80	1.29
Indole GLS biosynthesis						
1.13	AT4G31500		Cytochrome P450 CYP83B1		1.61	1.03
-1.02	AT5G57220		Cytochrome P450 CYP81F2		1.86	-1.12
1.18	AT1G62570		Flavin-containing monooxygenase FMO GS-OX4		1.76	1.05
GLS hydrolysis						
1.37	AT1G54010		Myrosinase-associated protein GLL23		-1.39	1.35
1.05	AT1G54040		Epithiospecifier protein ESP		-1.08	1.04
-1.11	AT3G16400		Nitrile-specifier protein NSP1		-1.72	1.03
Flanonoid biosynthesis						
1.63	AT5G05270		Chalcone-flavanone isomerase (CHI)		1.27	1.32
1.63	AT4G22870		Leucoanthocyanidin dioxygenase LDOX		1.17	1.36
1.67	AT5G07990		Flavonoid 3'-monooxygenase CYP75B1		1.09	1.25
1.68	AT5G13930		Naringenin-chalcone synthase (CHS)		1.38	1.23
1.59	AT1G66390		Transcription factor MYB90/PAP2		1.37	1.01
2.23	AT5G17220		Glutathione-S-transferase GSTF12	6	1.34	1.74
1.39	AT1G30530		UDP-glycosyltransferase UGT78D1		-1.02	1.42
-2.15	AT1G71030		Transcription factor MYB-like 2	2	-1.86	-1.45
1.10	AT2G29500		17.6kDa class I heat shock protein 2 (HSP17.6B)	5	2.87	-1.02
1.07	AT5G12020		17.6kDa class II heat shock protein (HSP17.6)	5	3.05	1.04
1.20	AT3G46230		17.4kDa class I heat shock protein (HSP17.4A)	5	6.96	-1.03
1.08	AT1G07400		17.8kDa class I heat shock protein (HSP17.8)		1.96	1.21
1.52	AT5G52640		Heat shock protein 90-1 (HSP90-1)	5	3.11	-1.09
1.28	AT3G12580		Heat shock 70 kDa protein 4 (HSP70-4)	5	2.58	1.04
-1.08	AT5G02500		Heat shock 70 kDa protein 1 (HSP70-1)		-1.45	1.64
1.50	AT5G02490		Heat shock 70 kDa protein 2 (HSP70-2)	4	2.00	1.13
1.40	AT3G09440		Heat shock 70 kDa protein 3 (HSP70-3)	4	2.01	1.09
1.26	AT1G65280		DnaJ heat shock N-terminal domain-containing protein	5	2.34	1.15
1.08	AT4G25200		23.6kDa heat shock protein, mitochondrial (HSP23.6)		1.75	-1.01
1.50	AT5G51440		23.5kDa heat shock protein, mitochondrial (HSP23.5)	4	2.86	1.15
-1.08	AT2G28000		Chaperonin 60 subunit alpha 1 (CPN60A1)		-1.65	1.60
1.24	AT5G20720		20 kDa chaperonin (CPN21)		-1.25	1.74
1.21	AT3G13470		Chaperonin 60 subunit beta 2 (CPN60B2)		1.02	1.59
-1.14	AT1G54050		17.4kDa class III heat shock protein (HSP17.4B)		-1.02	1.13
-1.20	AT1G59860		17.6kDa class I heat shock protein 1 (HSP17.6A)	6	1.00	1.27
-1.33	AT2G26150		Heat stress transcription factor A-2 (HSFA2)		1.12	1.04
-1.54	AT3G51910		Heat stress transcription factor A-7a (HSFA7A)		-1.87	-1.30
-1.67	AT5G62020		Heat stress transcription factor B-2a (HSFB2A)		-1.02	-1.22

Table 2 (Continued)

	10 Gy		TAIR ID	Name	C	40 Gy	
	26 h					2 h	
	2 h	26 h				2 h	26 h
	3.19	1.09	AT5G20850	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51)	4	9.50	1.50
	1.74	1.14	AT5G66130	Cell cycle checkpoint protein RAD17	4	3.16	1.05
	2.85	1.11	AT1G09815	DNA polymerase delta subunit 4 (POLD4)	4	6.24	1.45
	1.24	-1.05	AT2G27120	DNA polymerase (TIL2)	5	2.43	1.06
	-3.68	-2.58	AT1G67500	DNA polymerase REV3	2	-3.08	-1.58
	1.69	1.00	AT4C19130	Replication factor RFA1	4	2.90	1.23
	1.84	1.28	AT2G21790	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (RNR1)	4	3.60	1.75
	6.40	1.58	AT3G27060	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain C (TSO2)	4	15.49	2.76
	4.02	1.43	AT3G07800	Thymidine kinase	4	12.51	2.10
	1.72	1.13	AT4C37490	Cyclin CYCB1;1	4	4.28	1.25
	-1.14	1.23	AT2G26760	Cyclin CYCB1;4	4	-1.59	1.02
	2.39	1.04	AT5G03780	Protein TRF-like 10 (TRFL10)	4	5.07	1.42
	2.96	1.06	AT2G45460	FHA domain-containing protein	4	6.46	1.38
	3.62	1.10	AT5G48720	X-ray induced gene 1 (XRI1)	4	9.45	1.45
	2.70	1.09	AT5G60250	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	4	5.43	1.75
	1.44	-1.02	AT5G40840	Sister chromatid cohesion 1 protein 2 (SYN2/ATRAD21.1)	4	2.42	1.21
	1.50	1.07	AT4G29170	Meiotic nuclear division protein 1 homolog (MND1)	4	3.35	1.09
	1.53	1.01	AT3G19150	Cyclin-dependent kinase inhibitor 6 (KRPP6)	4	2.51	1.19
	1.39	-1.08	AT5G22010	Replication factor RFC1	5	2.28	1.09
	1.34	-1.08	AT3G52115	Protein gamma response 1 (GRI)	5	2.17	-1.03
	1.22	-1.18	AT3G53230	Cell division control protein 48 homolog D (CDC48D)	4	1.79	-1.07
	1.30	1.09	AT3G07810	RNA recognition motif-containing protein	4	1.68	1.15
	1.03	-1.34	AT4C33050	Embryo sac development arrest protein	4	1.66	-1.04
	1.29	1.09	AT1G19025	EDA39	4	1.65	1.26
	1.15	-1.05	AT3G19210	DNA repair metallo-beta-lactamase family protein	4	1.59	1.00
	1.14	-1.06	AT3G15430	Rad54-like protein (RAD54)	4	1.57	-1.18
	1.21	1.14	AT1G13330	Regulator of chromosome condensation RCC1	4	1.98	1.18
	1.33	1.35	AT5G65360	Homologous-pairing protein 2 homolog AHP2 (HOP2)	4	2.19	1.66
	-1.11	1.53	AT1G09200	Histone H3.2 (HTR1)	4	-1.42	1.73
	1.10	1.41	AT5G22650	Histone H3.2 (HTR2)	4	-1.09	1.57
	-1.12	1.47	AT5G59870	Histone deacetylase HDT2	4	-1.72	1.74
	-1.17	1.47	AT5G10390	Probable histone H2A.7	4	-1.68	1.79
	-1.24	1.36	AT5G27670	Histone H3.2 (HTR13)	4	-1.64	1.28
	-1.17	1.18	AT2G37470	Histone H2A.5	4	-1.83	1.35
	-1.32	1.41	AT3G27360	Histone H2B.4	4	-2.06	1.54
	-1.31	1.44	AT5G59970	Histone H3.2 (HTR3)	1	-1.82	1.33
	-1.34	1.52	AT3C46320	Histone H4	4	-1.99	1.45
	-1.76	-1.13	AT1C80850	Histone H4	4	-1.10	-1.10
	-1.08	1.73	AT1G44900	Methyladenine glycosylase family protein	4	-1.35	1.05
	-1.07	1.59	AT3G12610	Minichromosome maintenance protein 2 (MCM2)	4	-1.41	1.20
				DNA-damage-repair/tolerance protein DRT100	4		

Cell cycle &amp; DNA-metabolism

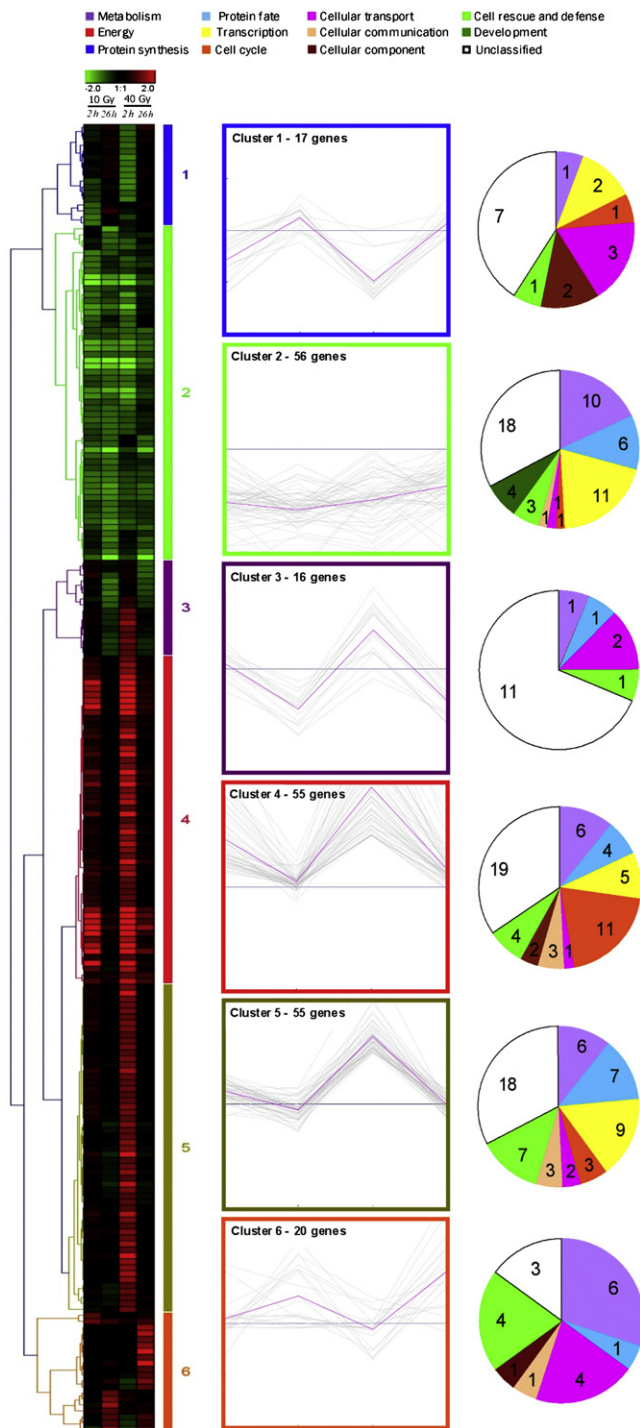
Table 2 (Continued)

	10 Gy		TAIR ID	Name	C	40 Gy	
	2 h	26 h				2 h	26 h
	Growth & cell wall	-1.14				1.40	AT2G37640
	-1.77	1.09	AT2G40610	Expansin-A8 (EXPA8)	1	-2.53	1.15
	1.04	1.27	AT2G03090	Expansin-A15 (EXPA15)		-1.65	-1.14
	1.01	1.33	AT4G28250	Expansin-B3 (EXPB3)	1	-2.22	-1.12
	-1.11	1.29	AT1G08560	Syntaxin-related protein KNOLLE (KN)		-1.86	1.23
	-1.16	1.31	AT5G25090	Early nodulin-like protein ATNODL13	1	-2.37	1.22
	-1.20	1.30	AT4C31840	Early nodulin-like protein ATNODL15	1	-2.34	1.21
	-1.13	1.45	AT5G47500	Probable pectinesterase 68 (PME68)		-1.78	1.15
	1.06	1.39	AT4G37800	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 7 (XTH7)		-1.63	1.28
	-2.57	-2.13	AT5G49360	Beta-D-xylosidase 1 (BXL1)	2	-3.14	-1.75
	1.49	1.08	AT3G55005	Tonneau TON1b	4	2.17	1.01
	1.60	1.11	AT5G23910	ATP binding microtubule motor family protein	4	2.80	1.23
	1.02	1.61	AT3G16370	GDSL esterase/lipase APG		-1.48	1.58
	1.17	1.75	AT1G29670	GDSL esterase/lipase		-1.13	1.61
	-1.20	1.22	AT1G33811	GDSL esterase/lipase		-1.60	1.61
	1.12	1.81	AT4G28780	GDSL esterase/lipase		-1.61	1.30
	1.02	1.63	AT5G45950	GDSL esterase/lipase		-1.35	1.44
	1.11	1.83	AT3G04290	GDSL esterase/lipase LTL1		-1.38	1.61
	1.00	-1.25	AT1G30370	Lipase-3 domain-containing protein		1.62	-1.25
	-1.07	-1.90	AT2G26560	Phospholipase A 2A		1.57	-1.38
	1.12	-1.23	AT3G48090	Enhanced disease susceptibility EDS1	5	2.04	-1.10
	1.42	-1.08	AT5G14930	Senescence-associated protein 101 (SAG101)	5	2.52	1.06
	1.03	-1.26	AT3G52430	Phytoalexin deficient PAD4		1.59	-1.23
	-1.50	-1.98	AT5G14180	Triacylglycerol lipase 2 (LIP2)		-1.51	-1.43
	-1.36	-1.69	AT5G18630	Triacylglycerol lipase-like protein		-1.24	-1.62
	1.09	1.68	AT1G45201	Triacylglycerol lipase-like 1 protein (TLL1)		-1.30	1.48
	1.06	1.65	AT1G06360	Delta-9 desaturase-like 5 protein		-1.43	1.33
	-1.36	-1.05	AT4G25140	Oleosin 18.5 kDa	6	-1.04	2.36
	1.13	1.01	AT5G51210	Oleosin 14.9 kDa (OL3)		-1.04	1.60
	-1.05	1.14	AT3G27660	Oleosin 20.3 kDa (OL2)	6	-1.18	2.05
	1.01	1.01	AT3G01570	Oleosin 5		1.03	1.80
	-1.81	-1.80	AT5G56100	Oleosin, putative	2	-2.39	-1.38
	1.24	-1.61	AT4G12470	Lipid transfer protein (LTP) family protein		1.58	1.34
	1.28	1.01	AT3G22620	LTP family protein		1.59	-1.48
	1.48	-1.67	AT4G22470	LTP family protein		1.95	1.17
	1.01	-1.30	AT4G12490	LTP family protein		1.28	1.61
	1.01	1.49	AT3G43720	Lipid-transfer-like protein		-1.42	1.67
	-1.11	1.12	AT2G38530	Non-specific lipid-transfer protein 2 (LTP2)		-1.20	1.72
	1.13	1.11	AT4G22490	LTP family protein	6	-1.44	2.07
	-1.01	-1.62	AT4G12480	LTP family protein		1.18	1.16
	1.20	1.61	AT3G08770	Non-specific lipid-transfer protein 6 (LTP6)		-1.24	1.61
	-1.10	-2.39	AT5G59320	Non-specific lipid-transfer protein 3 (LTP3)	3	1.23	-1.82
	-1.04	-1.67	AT5G59310	Non-specific lipid-transfer protein 4 (LTP4)		1.01	-1.04
	1.04	-1.14	AT3G22600	Non-specific lipid-transfer protein (AAXYP8)		1.59	-1.89
	1.20	-1.21	AT2G48140	Embryo sac development arrest protein EDA4		1.33	-1.67
	-1.06	1.07	AT4G28520	12S seed storage protein CRU1		-1.01	1.93
	-1.01	1.00	AT1G03880	12S seed storage protein CRU3	6	-1.06	4.48
	-1.08	1.36	AT5G44120	12S seed storage protein CRU4	6	1.02	5.56
	1.11	1.10	AT4G27140	2S seed storage albumin AT2S1	6	-1.10	3.31
	-1.06	-1.05	AT4G27150	2S seed storage albumin AT2S2	6	-1.06	2.74
	1.09	1.01	AT5G54740	2S seed storage albumin AT2S5	6	-1.06	2.82
	-1.05	1.04	AT2G28490	Cupin domain-containing protein		-1.03	1.85

Recycling &amp; PCD/senescence

Table 2 (Continued)

10 Gy	TAIR ID	Name	C	40 Gy	
				2 h	26 h
1.10	AT4G14630	Germin-like protein subfamily 1 member 8 (GLP9)		1.83	-1.20
1.05	AT5G10380	E3 ubiquitin-protein ligase RING1 (ATL55)		1.75	1.04
1.34	AT3G28210	Zinc finger AN1 domain-containing stress-associated protein 12 (SAP12)	4	3.34	1.22
1.49	AT5G11460	Senescence-associated protein DUF581	4	2.85	1.15
-2.90	AT4G35770	Senescence-associated protein DIN1 (SEN1)	2	-1.75	-3.36
1.09	AT2G29350	Senescence-associated protein 13 (SAG13)		1.49	-1.18
-1.47	AT3G56400	Transcription factor WRKY70		1.24	-1.17
1.25	AT5G20000	26S proteasome subunit 8 homolog B (RP76B)	5	2.50	-1.04
1.22	AT3G15180	26S proteasome regulatory subunit 5		1.80	-1.02
2.06	AT5G66140	20S proteasome subunit alpha type-7-B (PAD2)	6	§	1.30
1.28	AT3G22630	20S proteasome subunit beta type-2-A (PBD1)		1.78	1.05
1.24	AT5G51740	Peptidase M48 family protein	5	2.03	1.05
1.22	AT1G49050	Aspartyl protease family protein	5	2.33	-1.05
1.58	AT5G67360	Subtilisin-like protease ARA12	4	2.66	1.29
1.22	AT3G43960	Cysteine proteinase, putative		1.62	1.09
-1.46	AT4G32940	Vacuolar-processing enzyme gamma-isozyme		-1.31	-1.50
-2.73	AT5G19120	Aspartic-type endopeptidase	2	-3.39	-1.28
-1.32	AT1G73260	Kunitz trypsin inhibitor KTI1	2	-1.15	-1.49
-1.02	AT5G43580	Serine protease inhibitor		1.01	-1.24
-1.28	AT1G72060	Serine-type endopeptidase inhibitor		1.14	-1.55
1.22	AT2G38870	Protease inhibitor, putative	5	2.05	1.05
-1.20	AT5G39610	Transcription factor ANAC092		-1.11	-1.22
-1.27	AT2G27050	Ethylene-insensitive 3-like 1 protein (EIL1)		-1.59	1.17
-1.71	AT1G22190	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-13		-1.58	-1.09
-1.64	AT4G17500	Ethylene-responsive transcription factor ERF1A		-1.26	-1.11
-2.09	AT5G47220	Ethylene-responsive transcription factor ERF2	2	-1.27	-1.74
-1.83	AT5G47230	Ethylene-responsive transcription factor ERF5		-1.14	-1.24
-1.96	AT1G74930	Ethylene-responsive transcription factor ERF018		-1.73	-1.13
-2.31	AT5G61600	Ethylene-responsive transcription factor ERF104	1	-1.25	1.00
-1.69	AT5G51190	Ethylene-responsive transcription factor ERF105		-1.15	1.06
-1.71	AT5G61590	Ethylene-responsive transcription factor ERF107	2	-1.84	-1.30
-1.69	AT1G13260	AP2/ERF and B3 domain-containing transcription factor RAV1		-1.48	1.06
-2.42	AT1G68840	AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor RAV2	2	-1.39	-1.19
-1.66	AT1G73500	MAP kinase kinase ATMKK9		1.00	-1.15
-1.02	AT5G25350	EIN3-binding F box protein 2 (EBF2)		1.06	-1.20
-1.25	AT4G25470	Dehydration-responsive element-binding protein 1 C (DREB1 C)		-1.07	1.05
-1.06	AT4G26200	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase ACS7		1.69	-1.14
1.37	AT1G05710	Ethylene-responsive protein, putative		1.75	1.11



**Fig. 3.** Hierarchical clustering (Genesis software 1.7.4: Pearson uncentered distances, average linkage, 6 clusters) of the highly regulated transcripts after IR exposure (10 and 40 Gy), corresponding expression view, and functional distribution of genes from each cluster according to the MIPS classification (Munich Information Center catalogue for Protein Sequences) – Institute of Bioinformatics and Systems Biology (IBIS) of the Helmholtz Zentrum München (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/>).

genes linked to cell cycle regulation and DNA repair or metabolism, and it comprised 17 of the 19 genes with a fold-change higher than 5, suggesting their important roles in the IR response. The cluster 5 gathered fifty-five genes showing a significant increased expression 2 h after 40 Gy irradiation. The functional classification revealed a great number of genes from transcription factor, protein fate, stress response, and metabolism categories. Finally, the

twenty transcripts which constituted the cluster 6 were mostly highly up-regulated at the 26 h time point.

#### 4. Discussion

Even if both IR doses used here are considered as moderate doses for *Arabidopsis* plantlets grown until the 1.02 developmental stage, only the 40 Gy dose significantly affected growth rate (Table 1), suggesting the overflow of plant acclimation capacities and thus different cellular and then molecular responses. This work has corroborated and extended two previous transcriptomic analyses of the immediate response (up to 5 h post-IR) or *Arabidopsis* young seedlings (before true leaves development) to 100 Gy  $\gamma$ -irradiation [14,15]. It is worth to be noted that despite differences in the experimental conditions with these two analyses, a high number of regulated genes were shared with our datasets. In total, our datasets shared 124 transcripts with those of Culligan et al. [14] and 199 with those of Ricaud and colleagues [15], among them 60 were shared between the three analysis and showed the same behaviour after 40 Gy and 100 Gy doses (Supplementary data; Table S4). This high number of similar regulations provides strong support for the robustness and validity of our results.

The present transcriptomic study, in combination with the previous proteomic analysis that we carried out in similar conditions [16], has allowed the comparison between IR responses at the transcriptome and the proteome levels. Both datasets corroborated the fact that far fewer genes (transcripts or proteins) were affected by the 10 Gy dose than by the 40 Gy one with main differences in the response 2 h after IR exposure (Fig. 1A and [16]). Thus, whereas the microarray data revealed a higher number of up-regulations at 2 h (61%), early proteome changes were mainly down-regulations (75%) [16]. Otherwise, there were very few 'gene to gene' correspondences between the transcriptomic and the proteomic results [16] with only ten genes shared by the two analyses (Supplementary data; Table S5). This lack of correspondence between transcriptome and proteome regulation, already reported by different works, underlines the need for combined transcriptomic and proteomic analyses [10]. When considering the functional pathways regulated by IR at both levels, the transcriptomic results (Fig. 2, Table S2) confirmed some trails given by the proteomic analysis [16] and pointed to new IR response mechanisms, revealing some key systems of the adaptive response and cell protection against IR which are discussed below.

##### 4.1. Photosynthesis acclimation

One of the trails already revealed by proteome study [16] and that has also been observed in the transcriptome (Table 2) is a differential effect of 10 and 40 Gy IR doses on genes involved in photosynthesis. Globally, the 10 Gy dose enhanced the early transcription of genes coding for five photosystem II (PSII) constituents, three chloroplast NADH dehydrogenases, two cytochrome b6f complex constituents, and two enzymes implied in the Calvin cycle. On the contrary, the 40 Gy dose repressed the transcription of some light-harvesting complex PSII and cytochrome b6f constituent genes, and a plastid-encoded subunit of a NAD(P)H dehydrogenase complex, whereas it up-regulated protein disulfide-isomerase *LQY1* acting in repair of photodamaged PSII complexes [30]. These responses could participate to replace damaged proteins in order to maintain photosynthetic activity in response to mild stress shortly after 10 Gy irradiation, and to decrease the oxidative pressure caused by IR exposure as it is often observed in other environmental stresses [31], since the photosystems are the main sites of ROS generation in the chloroplast. In this sense, the down-regulation by both doses and times of chaperone DnaJ *AtJ8* and *AtJ11* genes,

involved in regulation of the stability of the PSII protein complexes [32], could help to confer a greater plant tolerance to oxidative stress induced by IR.

#### 4.2. Control of free radicals

In agreement with previous proteome analysis [16], the 'oxidative stress response' functional sub-category was over-represented in the IR transcriptome (Table S2). Whereas proteins enhanced in 2-DE were classical ROS detoxification enzymes [16], the transcriptome up-regulations mostly concerned glutathione-S-transferase (GST) genes which were up-regulated 2 h after 40 Gy (Table 2). The 40 Gy regulated GSTs have been reported to be highly stress inducible and possess xenobiotic conjugating and glutathione peroxidase activities, notably *GSTF8* and *GSTU25* being very active toward hydroperoxides [23]. In addition, the immediate up-regulations of *NUDT7*, which maintains the cellular redox homeostasis by restoring NADH:NAD<sup>+</sup> normal balance [24], and of five UDP-glucosyl transferases [25] might likely be part of the antioxidant response too (Table 2). The importance of enzymatic antioxidant response to high IR doses has been widely studied [4] and recently pointed out by a transcriptomic analysis of *A. thaliana* response to IR [13].

On the other hand, in this context of free radical control mechanisms, proteomics already showed an adaptive response to the 10 Gy dose linked to antioxidant metabolite pathways, which consisted in the enhancement of glucosinolate (GLS) hydrolysis pathways [16]. At the transcriptomic level, the enhancement 26 h after 10 Gy irradiation of two GLS hydrolysis related transcripts, *GLL23* and *ESP*, strengthened this hypothesis (Table 2). The IR has already been reported to act on GLS hydrolysis product content (allyl isothiocyanate) in the Japanese species *Wasabia japonica* [10], and in vitro experimentations have showed antioxidant power for glucosinolates and their derivatives [26], supporting the hypothesis that GLSs could act as antioxidant in the case of low IR stress. Furthermore, transcriptomics also revealed a differential dose-dependent effect of IR on glucosinolate biosynthetic pathways (Table 2). Thus, the aliphatic GLS biosynthetic pathway seemed to be stimulated by the 10 Gy dose, whereas the 40 Gy dose up-regulated three genes related to the indole GLS biosynthesis [27,28]. The transcriptomic data also suggested that flavonoid pathway could be involved in the 10 Gy response since four genes related to their biosynthesis pathway and the transcription factor *MYB90/PAP2*, which regulates anthocyanins pigment production [29], were up-regulated 2 h after 10 Gy treatment (Table 2). The high and simultaneous induction of *GSTF12* was probably linked to this pathway as this GST poses a well characterised role as transporters of anthocyanins precursors into the vacuole [23]. Furthermore, the UDP-rhamnose:flavonol-3-O-rhamnosyltransferase *UGT78D1* was up-regulated at 26 h and the transcription factor *MYB-like 2*, which is a repressor of flavonoid biosynthesis, was down-regulated at 2 and 26 h. Post irradiation synthesis of phenylpropanoid compounds had already been reported several times, the common justification being their antioxidative power [7,8].

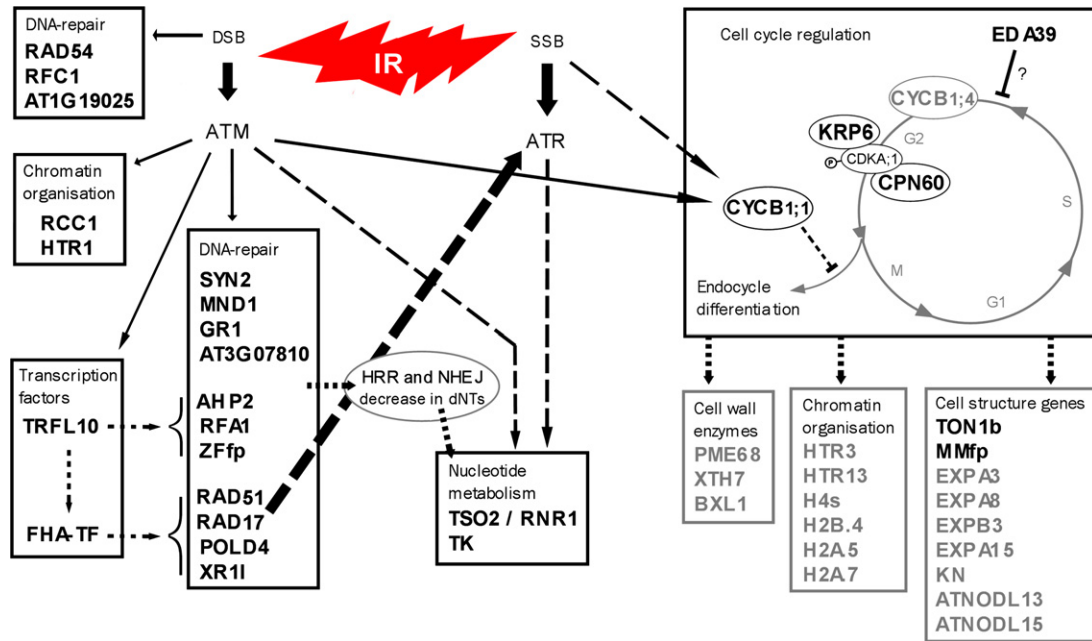
#### 4.3. Preservation of protein structural integrity

The 'heat shock response' functional sub-category of genes was also an important one over-represented after both IR doses (Table S2), notably heat shock proteins (HSPs) which prevent dysfunctional protein conformations caused by abiotic stresses [33]. The 40 Gy dose provoked many more up-regulations in genes coding for HSPs than the 10 Gy dose and their stimulations occurred mostly at the 2 h time point (Table 2). Most of these HSPs were classified in the cluster 5 constituted by 40 Gy-specific and immediate

inductions. Additionally, the 40 Gy dose also up-regulated three plastid chaperonins (*CPN60A1*, *CPN60B2* and *CPN21*) at 26 h (Table 2). The 10 Gy dose only led to up-regulations of four HSP/chaperonin genes at 26 h, showing a less urgent need of protection than after 40 Gy irradiation. These 10 Gy up-regulations are in good agreement with 10 Gy *HSFA2* up-regulation and *HSFB2A* down-regulation at 2 h as they appear to participate in the activation of the extended response to heat stress and in the attenuation of this response by repression of *Hsf* genes, respectively [34,35].

#### 4.4. Mechanisms of DNA repair

In addition to act on maintaining protein stability and integrity, another important level of response to oxidative/genotoxic stress is the activation of DNA metabolism and repairing mechanisms, and the corresponding regulation of cell cycle allowing these processes. Indeed, G2-phase cell cycle arrest has centred the interest of previous transcriptomic analyses of *Arabidopsis* early response to IR [14,15]. According to the current knowledge, the two kinases ATM and ATR are the first sensors of the signalling chain responding to double-strand break (DSB) events and occurrence of single-strand DNA respectively [14,15,36]. ATR and ATM transcripts did not show any significant level changes after 10 Gy or 40 Gy X-ray exposure, in our analysis, or 100 Gy  $\gamma$ -irradiation, but their essential role has been proven by knockout mutant approaches [14,15]. In our study, both IR doses immediately up-regulated in a dose dependent manner numerous genes (mainly from cluster 4) with function in DNA metabolism and repair (Table 2, Fig. 4). Most of these genes were involved in the downstream ATM-mediated DSB repair response as their IR-activation was absent in the ATM knockout mutant *atm* (Supplementary data; Table S6). Among these genes, the majority are implied in homologous recombination (HR) repair, like *RAD51*, *MND1* and *HOP2*, coding for three recombinases which participate together in mitosis, meiosis and DSB repair [37,38], or *SYN2/ATRAD21.1*, which codes for a sister chromatid cohesion protein implied in DSB repair [39] and was often co-expressed with *RAD51* and *MND1* (Table S6). On the other side, the IR up-regulated genes *XRI1* and *RAD17* have been proposed to participate in non-homologous DSB repair [40,41], the yeast homologous *rad17* being essential for the activation of ATR kinase during checkpoint responses [42]. The other genes that are IR induced via ATM activation and that may play roles in genome maintenance in response to DSBs included the DNA polymerase *POLD4*, the replication factor *RFA1*, the thymidine kinase AT3G07800, the histone *HTR1*, the regulator of chromosome condensation *RCC1*, and the two ribonucleotide di-P reductase genes *RNR1* and *TSO2*. Furthermore, the co-expression analysis on DNA-repair and cell cycle genes highlighted some less known IR up-regulated genes which are frequently co-regulated with ATM regulated genes and whose IR regulated transcription was missing in *atm* mutant (Table S6). Among them, AT2G45460, coding for a FHA domain-containing protein, and *TRFL10* are transcription factors which seem good candidates to participate in the transcriptional control under ATM activation. The co-expression data (Table S6) also suggested the transcriptional control of the FHA domain-containing transcription factor by *TRFL10*. Additionally, another DNA repair response independent of the ATM activation could be constituted by three DNA repair genes (helicase *RAD54*, *RFC1* and DNA repair metallo-beta-lactamase AT1G19025) significantly induced by the 40 Gy dose. Finally, the high down-regulation after 10 and 40 Gy treatments of the error-prone DNA polymerase *REV3*, which constitutes a translesion DNA synthesis mechanism [43] and was not regulated by 100 Gy [14,15], suggests that *Arabidopsis* in response to low IR doses preferred to temporarily reduce replication rather than use a mutagenic repair system.



**Fig. 4.** Proposed model of DNA-repair checkpoint cascade after ionising radiation exposure in plants. In bold: genes whose transcription was stimulated by the 40 Gy dose; in grey: genes which were down-regulated by 40 Gy. Full lines represent experimentally proven interactions; dashed lines denote hypothetical situations. SSB: single-strand break; DSB: double-strand break; HRR: homologous recombination repair; NHEJ: non-homologous end-joining; dNTs: deoxynucleotide triphosphates; ATM: Ataxia telangiectasia mutated kinase (TAIR ID: AT3G48190); ATR: Ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related homolog (AT5G40820). TSO2 (AT3G27060); RNR1 (AT2G21790); TRFL10 (AT5G03780); FHA-TF (AT2G45460); POLD4 (AT1G09815); XRI1 (AT5G48720); ZFfp (AT5G60250); RFA1 (AT4G19130); TK (AT3G07800); RCC1 (AT3G15430); HTR1 (AT5G65360); MND1 (AT4G29170); RAD54 (AT3G19210); GR1 (AT3G52115); SYN2 (AT5G40840); RFC1 (AT5G22010); AT1G19025: DNA repair metallo-beta-lactamase family protein; AT3G07810: RNA recognition motif-containing protein; RAD17 (AT5G66130); RAD51 (AT5G20850); CDKA;1 (AT3G48750); CYCB1;1 (AT4G37490); CYCB1;4 (AT2G26760); KRP6 (AT3G19150); CPN60 (AT2G28000); EXPA3 (AT2G37640); EXPA8 (AT2G40610); EXPB3 (AT4G28250); EXPA15 (AT2G03090); KN (AT1G08560); ATNODL13 (AT5G25090); ATNODL15 (AT4G31840); TON1b (AT3G55005); MMfp (AT5G23910); PME68 (AT5G47500); XTH7 (AT4G37800); BXL1 (AT5G49360); HTR3 (AT3G27360); HTR13 (AT5G10390); H4s: Histone H4 genes AT3G46320 and AT5G59970; H2B.4 (AT2G37470); H2A.5 (AT5G27670); H2A.7 (AT5G59870). ↓: kinase activation. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

#### 4.5. Cell cycle regulation

Some cell cycle effectors were also regulated after the 40 Gy dose (Table 2, Fig. 4), rather showing a cell cycle delay or arrest. This is the case of the cyclin-dependent kinase inhibitor *KRP6*, notably found in the interactome of *CDKA;1* [44], and the cyclin *CYCB1;1*. Accumulation of *KRP6* has been shown to inhibit mitosis [45] and the immediate ATM/ATR-dependent IR induction of *CYCB1;1* has been proposed to prevent premature differentiation of DNA damaged cells [14,35,46]. On the contrary, the cyclin *CYCB1;4* was down-regulated by 40 Gy, which was also previously observed in bleomycin (a DNA DSBs inducer) treated plants [47]. B-type cyclin expression patterns are specific to the G2/M phase of the cell cycle but no interacting partners of *CYCB1;4* were detected yet in the interactome assays [48]. Corroborating a cell cycle arrest, gene coding for the embryo sac development arrest protein *EDA39* was up-regulated after 40 Gy irradiation. Furthermore, seven over the nine cell cycle related genes down-regulated 2 h after 40 Gy codes for histones which are required for the formation of chromatin and allow for efficient replication and segregation of chromosomes.

Some down-regulations of cellular structure related genes and of cell wall modifying enzyme genes after the 40 Gy dose could be likely linked to the cell cycle arrest (Table 2, Fig. 4), and maybe it was also the case for *ATNODL13* and *ATNODL15* which have been proposed to play a role in cell wall organisation and cell differentiation under stress condition [49]. However, two structural genes related to mitosis, tonneau *TON1b* and ATP binding microtubule motor family *AT5G23910*, were strongly induced after 40 Gy. The protein *TON1b* binds cytoskeletal structures and is essential for the preprophase band formation. It has also been shown to interact with the protein *CDKA;1* [44,50]. As the temporary cell cycle arrest

caused by IR occurs in G2 phase [14], its production could mediate a consolidation of preprophase structures in order to delay mitosis. Our previous proteomic analysis revealed a high regulation of the *CDKA;1* interactor *EMB1796* [16]. Thus, *CDKA;1* seems to hold a central role in the cell cycle arrest as three of its interactors were also regulated at the transcriptional level: the previously cited *KRP6* and *TON1b*, and the chloroplast chaperonin *CPN60A1* [44]. In agreement with a possible regulation of *CDKA;1* activity by different regulators in response to radiation, the temporary inhibition of mitosis caused by salt stress in *A. thaliana* roots was correlated to a decrease of CDK activity without affecting the *CDKA;1* protein level, which means that the cell cycle arrest was most likely mediated by posttranslational control of CDK activity [51]. The enhancement of DNA-repair and G2/M phase cell cycle effectors genes occurred immediately after irradiation but most of these genes were no longer regulated at 26 h. This could be simply explained as the average cell cycle duration was shown to be 18.5 h at this development stage and it seems to be not much affected by moderate stress conditions [51]. Thus, cell cycle arrest and DNA repair would be very transient after 40 Gy and would only concern cells which were approaching the G2/M transition. Then, the repaired cells would divide but transitory cell cycle arrest will result in the observed slight root growth reduction 26 h after 40 Gy treatment (Table 1).

#### 4.6. Programmed cell death and recycling

In the cases where damages are too much important and thus repairing process are not fully successful, the following step of acclimation and survival at the tissular and whole-organism level is the regulation of the programmed death of the cell (PCD), senescence and nutrient recycling. Thus, the functional analysis of the



transcriptomic response to IR also underlined an enrichment in genes related to PCD, senescence, and nutrient recycling after 40 Gy treatment. So we observed the overexpression 2 h or 26 h after 40 Gy treatment of genes involved in lipid catabolism (storage and transport, or coding for proteases and storage proteins (Table 2). Those regulations seemed to illustrate the recycling of cellular components likely to be associated with a beginning of PCD and senescence induced by the 40 Gy dose. Thus, the strong induction of *EDS1* and *SAG101*, and to a lesser extent of *ATL55* and *PAD4*, by 40 Gy is very significant in terms of regulation of these responses. *Arabidopsis ATL55*, encoding a E3 ubiquitin-protein ligase RING1, has been shown to be involved in the regulation of plant PCD [52], and the interaction and complex formation between the products of *EDS1*, *SAG101* and *PAD4* controls the plant immune response against many pathogens and the PCD associated with this response [53]. Moreover, the latter notably constitute an antagonistic regulation system with the 40 Gy up-regulated *NUDT7* gene whose protective effect against ROS raises the threshold at which *EDS1* can trigger cell death [23,54]. In addition, genes related to senescence such as the genes coding for *SAP12*, a zinc finger AN1 domain-containing stress-associated protein which is involved in transcriptional regulation of senescence [55], and the senescence-associated protein *DUF581* were highly up-regulated 2 h after 40 Gy treatment, and seven of the previously cited recycling-related genes were also up-regulated in the recent transcriptomic study on *A. thaliana* senescent leaves [56]. Interestingly, other senescence-associated genes (i.e. *SAG13*, *MKK9*, *WRKY70*, and *SEN1*), mostly unaffected by 40 Gy, were down-regulated after 10 Gy treatment.

An opposite behaviour for PCD, senescence and nutrient recycling in response to 10 Gy and 40 Gy IR doses could be related to differential ethylene regulation since a consistent number of elements of ethylene signalling pathways are down-regulated in response to 10 Gy treatment (Table 2). Furthermore, the transcriptional activator *DREB1C*, which overexpression was shown to suppress the responsiveness of leaf tissue to ethylene [57], was up-regulated after 10 Gy IR exposure. Ethylene signalling pathways modulate PCD events [58] and the above mentioned regulations could be part of mechanisms for blocking unwanted ethylene responses. On the contrary, at short time after 40 Gy exposure both *ACS7*, coding for one of the *Arabidopsis* ACC synthases which are key enzymes in the biosynthesis of ethylene, and *AT1G05710*, coding for an ethylene-responsive protein, were up-regulated.

In conclusion, this work broadly stated two kind of behaviour for gene regulation in response to low vs. moderate IR doses. Genes involved in protein maintenance, DNA repairing and cell cycle checkpoints were regulated in a dose-dependent quantitative manner. These mechanisms could be established in response to direct effects of IR on biomolecules (proteins and nucleic acids for instances) where photons interact with atoms to produce fast-moving electrons that directly hits and breaks biomolecules. Thus, these effects, which are repairable to some extent, are unavoidable and proportional to the radiation energy absorbed in the tissues. On the other hand, different pathways of the oxidative stress response, photosynthesis acclimation and PCD/senescence were regulated depending on the IR dose. These differential qualitative responses could be associated to the indirect action of IR through ROS production by water radiolysis and linked in chain reactions. Indirect production of ROS is also proportional to absorbed IR intensity, but its effects (i.e. oxidative stress) are not as they are avoidable by appropriate ROS signalling inducing protective defence mechanisms (e.g. different ROS scavenging mechanisms). Therefore, these cell responses to IR differed depending on cell situation before or after an IR modulated threshold for signalling for acclimation (reversible physiological changes after balanced ROS production by 10 Gy irradiation) or death (irreversible damage after imbalanced ROS production by 40 Gy irradiation).

## Acknowledgements

M.G. was supported by a Doctoral research grant (211-B2-9/ARED, ELODIE project) from the Région Bretagne (France).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.06.015>.

## References

- [1] M. Gardès-Albert, Chapitre II. Chimie sous rayonnement, in: M. Tubiana, D. Averbek, M. Bourguignon, J. Bourhis, J.-J. Cassiman, J.-M. Cosset, V. Favaudon, M. Gardès-Albert, T. Girinski, P. Gourmelon, S. Helfre, E. Lartigau, R. Masse, A. Wambersie (Eds.), *Radiobiologie: Radiothérapie et radioprotection – bases fondamentales*, Hermann/Médecine, Hermann Editors, Paris, 2008, pp. pp41–pp70.
- [2] C. Chenal, F. Legue, K. Nourgalieva, V. Brouazin-Jousseau, S. Durel, N. Guitton, Exposition of human to low doses and low dose rate irradiation: an urgent need for new markers and new models, *Radiation Biology and Radioecology* 40 (2000) 627–629.
- [3] H. Vandenhove, N. Vanhoudt, A. Cuypers, M. Van Hees, J. Wannijn, N. Horemans, Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways, *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (2010) 778–786.
- [4] N. Vanhoudt, H. Vandenhove, N. Horemans, J. Wannijn, M. Van Hees, J. Vangronsveld, A. Cuypers, The combined effect of uranium and gamma radiation on biological responses and oxidative stress induced in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Environmental Radioactivity* 101 (2010) 921–930.
- [5] M.-A. Esnault, F. Legué, C. Chenal, Ionizing radiation: advances in plant response, *Environmental and Experimental Botany* 68 (2010) 231–237.
- [6] J.-H. Kim, B.Y. Chung, J.-S. Kim, S.G. Wi, Effects of *in planta* gamma-irradiation on growth, photosynthesis, and antioxidative capacity of red pepper (*Capsicum annuum* L.) plants, *Journal of Plant Biology* 48 (2005) 47–56.
- [7] A.K. Dixit, D. Bhatnagar, V. Kumar, A. Rani, J.G. Manjaya, D. Bhatnagar, Gamma irradiation induced enhancement in isoflavones, total phenol, anthocyanin and antioxidant properties of varying seed coat colored soybean, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2010) 4298–4302.
- [8] T. Nagata, H. Yamada, Z. Du, S. Todoriki, S. Kikuchi, Microarray analysis of genes that respond to  $\gamma$ -irradiation in *Arabidopsis*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 1022–1030.
- [9] C.D. Hung, K. Johnson, Effects of ionising radiation on the growth and allyl isothiocyanate accumulation of *Wasabia japonica* in vitro and ex vitro, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 44 (2008) 51–58.
- [10] L.M. Liberman, R. Sozzani, P.N. Benfey, Integrative systems biology: an attempt to describe a simple weed, *Current Opinion in Plant Biology* 15 (2012) 162–167.
- [11] I. Kovalchuk, J. Molinier, Y. Yao, A. Arkhipov, O. Kovalchuk, Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation, *Mutation Research* 624 (2007) 101–113.
- [12] J.-H. Kim, Y.R. Moon, J.S. Kim, M.H. Oh, J.W. Lee, B.Y. Chung, Transcriptomic profile of *Arabidopsis* rosette leaves during the reproductive stage after exposure to ionizing radiation, *Radiation Research* 168 (2007) 267–280.
- [13] D.S. Kim, J.-B. Kim, E.J. Goh, W.-J. Kim, S.H. Kim, Y.W. Seo, C.S. Jang, S.-Y. Kang, Antioxidant response of *Arabidopsis* plants to gamma irradiation: Genome-wide expression profiling of the ROS scavenging and signal transduction pathways, *Journal of Plant Physiology* 168 (2011) 1960–1971.
- [14] K.M. Culligan, C.E. Robertson, J. Foreman, P. Doerner, A.B. Britt, ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionising radiation, *Plant Journal* 48 (2006) 947–961.
- [15] L. Ricaud, C. Proux, J.-P. Renou, O. Pichon, S. Fochesato, P. Ortet, M.-H. Montané, ATM-mediated transcriptional and developmental responses to gamma-rays in *Arabidopsis*, *PLoS ONE* 2 (2007) e430.
- [16] M. Gicquel, M.-A. Esnault, J.V. Jorin Novo, F. Cabello-Hurtado, Application of proteomics to the assessment of the response to ionising radiation in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Proteomics* 74 (2011) 1364–1377.
- [17] D.C. Boyes, A.M. Zayed, R. Ascenzi, A.J. McCaskill, N.E. Hoffman, K.R. Davis, J. Görlach, Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants, *Plant Cell* 13 (2001) 1499–1510.
- [18] S. Gagnot, J.-P. Tamby, M.-L. Martin-Magniette, F. Bitton, L. Tacconat, S. Balzer-gue, S. Aubourg, J.-P. Renou, A. Lechamy, V. Brunaud, CATdb: a public access to *Arabidopsis* transcriptome data from the URGV-CATMA platform, *Nucleic Acids Research* 36 (2008) D986–D990.
- [19] C. Lurin, C. Andrés, S. Aubourg, M. Bellaoui, F. Bitton, C. Bruyère, M. Caboche, C. Debast, J. Gualberto, B. Hoffmann, A. Lechamy, M. Le Ret, M.-L. Martin-Magniette, H. Mireau, N. Peeters, J.-P. Renou, B. Szurek, L. Tacconat, I. Small, Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis, *Plant Cell* 16 (8) (2004) 2089–2103.
- [20] Y.H. Yang, S. Dudoit, P. Luu, D.M. Lin, V. Peng, J. Ngai, T.P. Speed, Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation, *Nucleic Acids Research* 30 (2002) e15.

- [21] A. Sturn, J. Quackenbush, Z. Trajanoski, Genesis: cluster analysis of microarray data, *Bioinformatics* 18 (2002) 207–208.
- [22] K. Loizeau, V. De Brouwer, B. Gambonnet, A. Yu, J.-P. Renou, D. Van Der Straeten, W.E. Lambert, F. Rébeillé, S. Ravanel, A genome-wide and metabolic analysis determined the adaptive response of *Arabidopsis* cells to folate depletion induced by methotrexate, *Plant Physiology* 148 (2008) 2083–2095.
- [23] D.P. Dixon, R. Edwards, Glutathione transferases *The Arabidopsis Book*, 8, 2010, p. e0131.
- [24] N. Jambunathan, A. Penaganti, Y. Tang, R. Mahalingam, Modulation of redox homeostasis under suboptimal conditions by *Arabidopsis* nudix hydrolase 7, *BMC Plant Biology* 10 (1) (2010) 173–188.
- [25] G. Sepúlveda-Jiménez, P. Rueda-Benítez, H. Porta, M. Rocha-Sosa, A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress, *Journal of Experimental Botany* 56 (2005) 605–611.
- [26] F. Cabello-Hurtado, M. Gicquel, M.-A. Esnault, Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective, *Food Chemistry* 132 (2012) 1003–1009.
- [27] M.Y. Hirai, A robust omics-based approach for the identification of glucosinolate biosynthetic genes, *Phytochemistry Reviews* 8 (1) (2009) 15–23.
- [28] M. Pfalz, H. Vogel, J. Kroymann, The gene controlling the indole glucosinolate modifier1 quantitative trait locus alters indole glucosinolate structures and aphid resistance in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 21 (2009) 985–999.
- [29] L. Lepiniec, I. Debeaujon, J.-M. Routaboul, A. Baudry, L. Pourcel, N. Nesi, M. Caboche, Genetics and biochemistry of seed flavonoids, *Annual Review of Plant Biology* 57 (2006) 405–430.
- [30] Y. Lu, D.A. Hall, R.L. Last, A small zinc finger thylakoid protein plays a role in maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell* 23 (2011) 1861–1875.
- [31] N.L. Taylor, Y.F. Tan, R.P. Jacoby, A.H. Millar, Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes, *Journal of Proteomics* 72 (2009) 367–378.
- [32] K.-M. Chen, M. Holmstrom, W. Raksajit, M. Suorsa, M. Piippo, E.-M. Aro, Small chloroplast-targeted DnaJ proteins are involved in optimization of photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana*, *BMC Plant Biology* 10 (2010) 43–58.
- [33] W. Wang, B. Vinocur, O. Shoseyov, A. Altman, Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response, *Trends in Plant Science* 9 (2004) 244–252.
- [34] Y.Y. Charnq, H.C. Liu, N.Y. Liu, W.T. Chi, C.N. Wang, S.H. Chang, T.T. Wang, A Heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 143 (2007) 251–262.
- [35] M. Ikeda, N. Mitsuda, M. Ohme-Takagi, *Arabidopsis* HsfB1 and HsfB2b Act as repressors of the expression of heat-inducible Hsfs but positively regulate the acquired thermotolerance, *Plant Physiology* 157 (2011) 1243–1254.
- [36] T. Cools, L. De Veyler, DNA stress checkpoint control and plant development, *Current Opinion in Plant Biology* 12 (2009) 23–28.
- [37] K. Osakabe, K. Abe, H. Yamanouchi, T. Takyuu, T. Yoshioka, Y. Ito, T. Kato, S. Tabata, S. Kurei, Y. Yoshioka, Y. Machida, M. Seki, M. Kobayashi, K. Shinozaki, H. Ichikawa, S. Toki, *Arabidopsis* Rad51B is important for double-strand DNA breaks repair in somatic cells, *Plant Molecular Biology* 57 (6) (2005) 819–833.
- [38] C. Kerzendorfer, J. Vignard, A. Pedrosa-Harand, T. Siwicz, S. Akimcheva, S. Jolivet, R. Sablowski, S. Armstrong, D. Schweizer, R. Mercier, P. Schlögelhofer, The *Arabidopsis thaliana* MND1 homologue plays a key role in meiotic homologous pairing, synapsis and recombination, *Journal of Cell Science* 119 (2006) 2486–2496.
- [39] J.A. Da Costa-Nunes, A.M. Bhatt, S. O'Shea, C.E. West, C.M. Bray, U. Grossniklaus, H.G. Dickinson, Characterization of the three *Arabidopsis thaliana* RAD21 cohesins reveals differential responses to ionizing radiation, *Journal of Experimental Botany* 57 (4) (2006) 971–983.
- [40] F. Heitzeberg, I.P. Chen, F. Hartung, N. Orel, K.J. Angelis, H. Puchta, The Rad17 homologue of *Arabidopsis* is involved in the regulation of DNA damage repair and homologous recombination, *Plant Journal* 38 (2004) 954–968.
- [41] C.E. West, W.M. Waterworth, P.A. Sunderland, C.M. Bray, *Arabidopsis* DNA double-strand break repair pathways, *Biochemical Society Transactions* 32 (2004) 964–966.
- [42] J. Lee, W.G. Dunphy, Rad17 plays a central role in establishment of the interaction between TopBP1 and the Rad9-Hus1-Rad1 complex at stalled replication forks, *Molecular Biology of the Cell* 21 (6) (2010) 926–935.
- [43] A. Sakamoto, V.T.T. Lan, Y. Hase, N. Shikazono, T. Matsunaga, A. Tanaka, Disruption of the *AtREV3* gene causes hypersensitivity to ultraviolet B light and gamma-rays in *Arabidopsis*: implication of the presence of a translesion synthesis mechanism in plants, *Plant Cell* 15 (9) (2003) 2042–2057.
- [44] J. Van Leene, H. Stals, D. Eeckhout, G. Persiau, E. Van De Slijke, G. Van Isterdael, A. De Clercq, E. Bonnet, K. Laukens, N. Remmerie, K. Henderickx, T. De Vijlder, A. Abdelkrim, A. Pharazyn, H. Van Onckelen, D. Inzé, E. Witters, G. De Jaeger, A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*, *Molecular & Cellular Proteomics* 6 (7) (2007) 1226–1238.
- [45] J. Liu, Y. Zhang, G. Qin, T. Tsuge, N. Sakaguchi, G. Luo, K. Sun, D. Shi, S. Aki, N. Zheng, T. Aoyama, A. Oka, W. Yang, M. Umeda, Q. Xie, H. Gu, L.J. Qu, Targeted degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK4/KRP6 by RING-type E3 ligases is essential for mitotic cell cycle progression during *Arabidopsis* gametogenesis, *Plant Cell* 20 (6) (2008) 1538–1554.
- [46] J. Van Leene, J. Hollunder, D. Eeckhout, G. Persiau, E. Van De Slijke, H. Stals, G. Van Isterdael, A. Verkest, S. Neiryneck, Y. Buffel, S. De Bodt, S. Maere, K. Laukens, A. Pharazyn, P.C. Ferreira, N. Eloy, C. Renne, C. Meyer, J.D. Faure, J. Steinbrenner, J. Beynon, J.C. Larkin, Y. Van de Peer, P. Hilson, M. Kuiper, L. De Veylder, H. Van Onckelen, D. Inzé, E. Witters, G. De Jaeger, Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*, *Molecular Systems Biology* 10 (2010) 397–409.
- [47] J. Moliniera, E.J. Oakeleya, O. Niederhauserb, I. Kovalchuk, B. Hohna, Dynamic response of plant genome to ultraviolet radiation and other genotoxic stresses, *Mutation Research* 571 (2005) 235–247.
- [48] J. Boruc, H. Van den Daele, J. Hollunder, S. Rombauts, E. Mylle, P. Hilson, D. Inzé, L. De Veylder, E. Russinova, Functional modules in the *Arabidopsis* core cell cycle binary protein-protein interaction network, *Plant Cell* 22 (4) (2010) 1264–1280.
- [49] K. Mashiguchi, T. Asami, Y. Suzuki, Genome-wide identification, structure and expression studies, and mutant collection of 22 early nodulin-like protein genes in *Arabidopsis*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73 (2009) 2452–2459.
- [50] J. Azimzadeh, P. Nacry, A. Christodoulidou, S. Drevensek, C. Camilleri, N. Amieur, F. Parcy, M. Pastuglia, D. Bouchez, *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin, *Plant Cell* 20 (8) (2008) 2146–2159.
- [51] G. West, D. Inzé, G.T.S. Beemster, Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress, *Plant Physiology* 135 (2004) 1050–1058.
- [52] S.-S. Lin, R. Martin, S. Mongrand, S. Vandenabeele, K.-C. Chen, I.-C. Jang, N.-H. Chua, RING1 E3 ligase localizes to plasma membrane lipid rafts to trigger FB1-induced programmed cell death in *Arabidopsis*, *Plant Journal* 56 (2008) 550–561.
- [53] S. Zhu, R.-D. Jeong, S.C. Venugopal, L. Lapchuk, D. Navarre, A. Kachroo, P. Kachroo, SAG101 forms a ternary complex with EDS1 and PAD4 and is required for resistance signaling against turnip crinkle virus, *PLoS Pathogens* 7 (11) (2011) e1002318.
- [54] P.M. Mullineaux, N.R. Baker, Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? *Plant Physiology* 154 (2010) 521–525.
- [55] E. Breeze, E. Harrison, T. Page, N. Warner, C. Shen, C. Zhang, V. Buchanan-Wollaston, Transcriptional regulation of plant senescence: from functional genomics to systems biology, *Plant Biology* 10 (2008) 99–109.
- [56] E. Breeze, E. Harrison, S. McHattie, L. Hughes, R. Hickman, C. Hill, S. Kiddle, Y.S. Kim, C.A. Penfold, D. Jenkins, C. Zhang, K. Morris, C. Jenner, S. Jackson, B. Thomas, A. Tabrett, R. Legaie, J.D. Moore, D.L. Wild, S. Ott, D. Rand, J. Beynon, K. Denby, A. Mead, V. Buchanan-Wollaston, High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation, *Plant Cell* 23 (3) (2011) 873–894.
- [57] M. Sharabi-Schwager, A. Samach, R. Porat, Overexpression of the CBF2 transcriptional activator in *Arabidopsis* suppresses the responsiveness of leaf tissue to the stress hormone ethylene, *Plant Biology* 12 (2010) 630–638.
- [58] C.P. Trobacher, Ethylene and programmed cell death in plants, *Botany* 87 (2009) 757–769.

### 3.4. Conclusion

La réponse transcriptomique d'*A. thaliana* présente des différences notables après les irradiations à 10 Gy et à 40 Gy. Cependant, la similitude de nos résultats de transcriptomique en réponse à 40 Gy et ceux de deux études réalisées utilisant des doses d'irradiation de 100 Gy est aussi remarquable. En effet, 124 gènes sont régulés comme dans l'étude de Culligan *et al.* (2006) et 199 gènes comme dans celle de Ricaud *et al.* (2007) ce qui appuie par la même la robustesse de notre analyse.

Parmi les effets les plus largement décrits des radiations se trouvent la production de dégâts moléculaires directs sur les biomolécules, notamment sur l'ADN et sur les protéines. En bon accord avec ces observations, nous avons constaté en réponse aux deux doses de radiation, une stimulation de la transcription de HSPs qui protègent les protéines, souvent en constituant des complexes pour replier les protéines altérées et empêcher leur disfonctionnement (Wang *et al.* 2004). La dose 40 Gy induit notamment la transcription de « petites HSPs » (17-18 kDa), de HSPs 70 et 90 (les deux paires *HSP90-1 / HSP70-4* et *HSP70-2 / HSP70-3* étant prédites pour interagir deux à deux), ainsi que des deux HSPs mitochondriales et trois chaperonnes plastidiales. A 10 Gy, seulement cinq gènes de HSPs ou de chaperonnes sont surexprimés, ce qui reflète un moindre besoin de protection des structures protéiques que pour 40 Gy.

Par ailleurs, les deux doses de radiation activent immédiatement et en intensité proportionnelle à la dose un nombre important de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Figure 22). La plupart d'entre eux dépendent de l'activation de la kinase ATM, premier senseur de la chaîne de signalisation contrôlant la progression du cycle cellulaire en réponse aux cassures double brin de l'ADN. Ils participent notamment aux processus de recombinaison (homologues ou non-homologues), de réparation et de réplication de l'ADN. D'après l'analyse bioinformatique de co-expression menée sur les gènes ATM-dépendants, les deux facteurs de transcription AT2G45460 et *TRFL10* pourraient être des maillons du contrôle transcriptionnel en aval de l'activation de ATM (Annexe 2 – Table S6). En supplément, certains gènes de réparation non ATM-dépendants sont aussi activés par les radiations.

Pour la dose 40 Gy, la transcription d'effecteurs du cycle cellulaire est également affectée, suggérant un ralentissement de ce dernier afin de permettre les réparations de l'ADN et d'empêcher la multiplication de mutations (Cools et De Veyler 2009). *KPR6* et la cycline

*CYCBI;1* sont surexprimées et pourraient empêcher respectivement la mitose et la différenciation cellulaire (Liu *et al.* 2008 ; Cools et De Veyler 2009). Au contraire, l'expression de la cycline *CYCBI;4* caractéristique de la phase G2/M, ainsi que celle de sept gènes codant pour des histones est sous exprimée après la dose 40 Gy.

D'autre part, dix gènes impliqués dans des structures cellulaires et la construction de la paroi sont sous exprimés après 40 Gy, ce qui pourrait être lié à l'arrêt du cycle cellulaire. A contrario, les gènes *TON1b* et *AT5G23910*, relatifs aux structures de la mitose, sont fortement surexprimés et pourraient participer à une consolidation des structures de préprophase pendant l'arrêt du cycle (Azimzadeh *et al.* 2008).

En parallèle, les radiations interagissent avec les molécules d'eau en générant des ROS responsables du stress oxydant cellulaire. Les deux doses que nous avons utilisées mettent en évidence l'existence d'un seuil d'intensité du stress déterminant soit une réponse d'acclimatation du métabolisme face à un faible stress, soit une lutte anti-oxydante plus active avec un basculement potentiel vers la mort cellulaire programmée de la cellule.

Ainsi, après une irradiation à la dose 10 Gy, certaines voies du métabolisme secondaire sont activées, telles que les voies de biosynthèse et d'hydrolyse des GLSs aliphatiques. C'est également le cas de la voie de biosynthèse des flavonoïdes avec six gènes de cette voie surexprimés, auxquels on peut ajouter *GSTF12* qui a été caractérisée comme transporteur des précurseurs des anthocyanes (Dixon et Edwards 2010). L'induction de la voie des flavonoïdes est également en accord avec la sous expression du facteur de transcription *MYB-like 2*, répresseur de celle-ci. La synthèse des GLSs et des flavonoïdes post-irradiation pourrait être le signe du pouvoir antioxydant de ces composés (Nagata *et al.* 2005 ; Dixit *et al.* 2010 ; Cabello-Hurtado *et al.* 2012).

On remarque par ailleurs que la dose 40 Gy semble stimuler la biosynthèse des GLSs indoliques (trois gènes surexprimés) et réprimer celle des GLSs aliphatiques.

La dose 40 Gy provoque une transcription immédiate de gènes d'enzymes antioxydantes et détoxifiantes (peroxydases (PER), glutathion-S-transférases (GST) et UDP-glucosyl transférases (UGT)). De plus, l'hydrolase *NUDT7* qui maintient l'homéostasie redox de la cellule en rétablissant l'équilibre normal NADH:NAD<sup>+</sup> est également surexprimée (Jambunathan *et al.* 2010).

La dose 40 Gy induit également rapidement la surexpression de gènes liés à la remobilisation des nutriments. Ainsi, le catabolisme, le stockage et le transport des lipides sont activés de même que l'on note la surexpression de protéases et de protéines de réserve.

Ceci semble illustrer le recyclage des composants cellulaires lors d'un début de PCD et sénescence associé à la dose 40 Gy. Cette hypothèse est appuyée par la forte surexpression de gènes associés à la sénescence ainsi que de quatre gènes impliqués dans la régulation de la PCD (i.e. *EDS1*, *SAG101* et *PAD4*, *ATL55* ; Lin *et al.* 2008 ; Zhu *et al.* 2011). *EDS1* constitue notamment un système de régulation antagoniste avec *NUDT7*, ce dernier régissant le seuil de stress antioxydant à partir duquel *EDS1* provoque la mort cellulaire. Ils sont donc partenaires dans le choix entre l'accumulation des ROS pour la PCD ou leur élimination par stimulation des défenses antioxydantes (Jambunathan *et al.* 2010 ; Mullineaux et Baker 2010).

Le déclenchement du phénomène de sénescence après irradiation pourrait être relié à la voie de signalisation de l'éthylène qui agit positivement sur les événements de PCD (Trobacher 2009). Quatorze gènes de réponse à l'éthylène, majoritairement des facteurs de transcription, sont réprimés en réponse au traitement 10 Gy (Figure 22) ce qui pourrait empêcher le déclenchement de la PCD. A contrario, certains éléments de cette voie sont surexprimés après la dose 40 Gy (Figure 22).

Les gènes relatifs à la photosynthèse sont également régulés différemment selon le niveau de stress produit. Les deux doses restreignent la transcription de constituants de l'antenne collectrice ce qui pourrait contribuer à diminuer la pression oxydative causée par les RI, les photosystèmes étant les principaux sites de production des ROS dans le chloroplaste. Dans ce sens, la sous expression maintenue dans le temps après irradiation par les deux doses des gènes codant pour les chaperones DnaJ AtJ8 et AtJ11, impliquées dans la stabilisation des protéines du PSII, pourrait conférer une meilleure tolérance des plantes au stress oxydant induit (Chen *et al.* 2010). Cependant, la dose 10 Gy stimule la transcription de gènes de constituants du PSII et autres éléments de la chaîne photosynthétique de transfert des électrons (complexe cytochrome b6f et NAD(P)H-déshydrogénases) et d'enzymes du cycle de Calvin. Ces régulations au niveau des structures pourraient participer à remplacer les protéines abîmées dans le but de maintenir une activité photosynthétique normale. Au contraire, la dose 40 Gy provoque la sous expression de gènes de la chaîne de transport électronique. Elle stimule par ailleurs la transcription de *LQY1* impliquée dans la réparation des PSII abîmés (Lu *et al.* 2011).

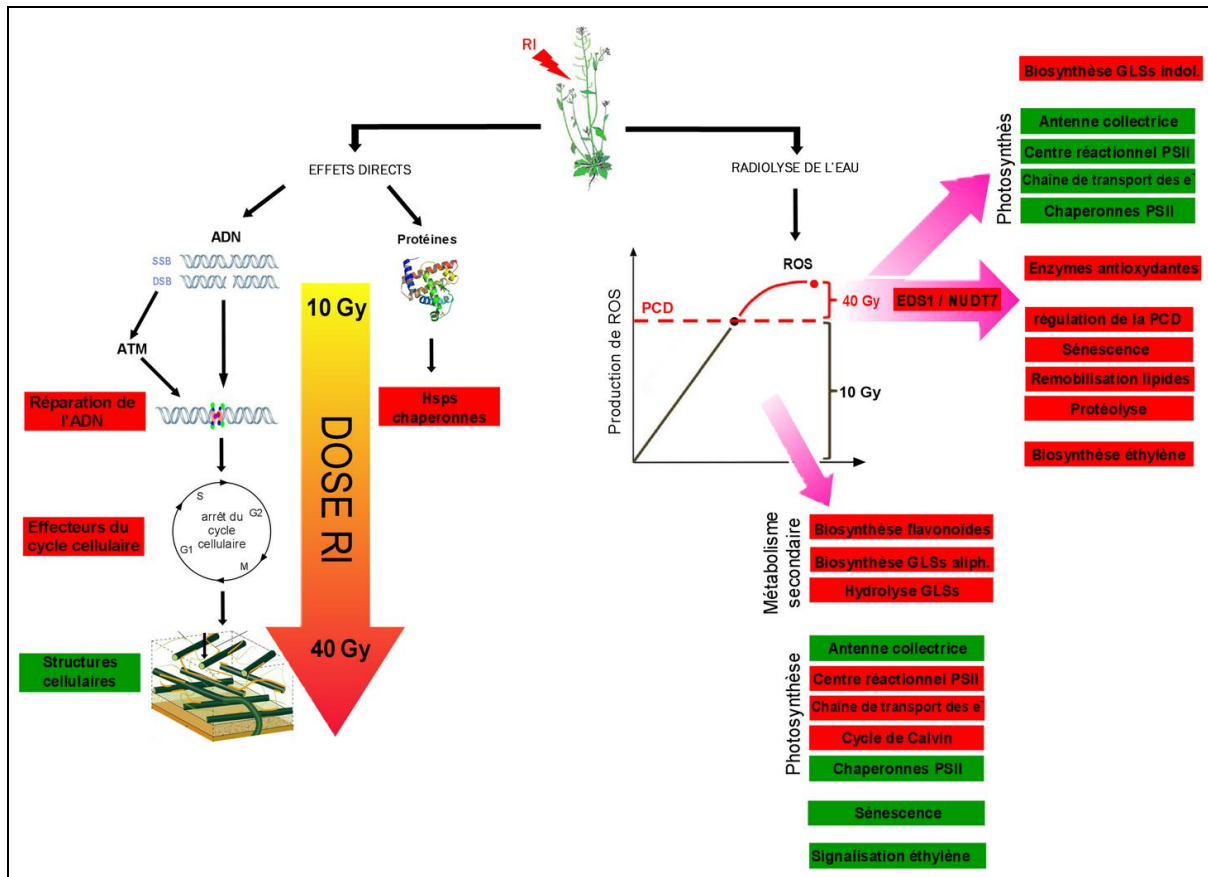


Figure 22 – Schéma récapitulatif des régulations transcriptomiques observées après des irradiations de 10 Gy et 40 Gy chez *A. thaliana*. En rouge = catégories de gènes surexprimées ; en vert = catégories de gènes sous-exprimées. RI = radiations ionisantes ; ATM = *Ataxia telangiectasia* mutated kinase AT3G48190 ; PCD = mort cellulaire programmée (angl. « programmed cell death ») ; EDS1 = AT3G48090 ; NUDT7 = AT4G12720.

#### 4. Discussion et conclusion du chapitre 1

Les radiations ionisantes affectent la croissance d'*A. thaliana* de manière dose-dépendante, surtout pour les racines dans les conditions utilisées. Comparativement à d'autres espèces végétales, c'est une espèce résistante puisque les doses 20 et 40 Gy n'empêchent pas la mise à fleur. L'effet des radiations est visible, par exemple, sur la biomasse de *Holcus lanatus* dès l'application d'une dose aiguë de 20 Gy (rayonnements  $\gamma$ ) avec une réduction de la masse sèche de 50% (Jones *et al.* 2004). Le feuillage rougit et meurt 30 jours après irradiation à 40 Gy. Un des signes forts de l'effet des radiations sur tous les modèles est la réduction de la taille des plantes comme pour *A. thaliana*. Cela a été montré à de nombreuses reprises par exemple chez la tomate (Bianchi *et al.* 1963), un Pelargonium (Grossman et Craig 1982), le pois (Bagi *et al.* 1988 ; Zaka *et al.* 2004), le riz et le haricot (Maity *et al.* 2005). On peut noter que le colza (*Brassica napus* L.), qui appartient à la même famille que *A. thaliana*, s'est révélé résistant à une dose de 40 Gy de RI dans les mêmes conditions d'application (résultats du laboratoire non publiés : réduction de la croissance à court terme mais la plante poursuit son cycle, fleurit et donne des graines ; non testé à 100 Gy). La famille des Brassicaceae semble donc relativement radiorésistante.

De manière surprenante, les teneurs en chlorophylle d'*A. thaliana* sont peu affectées dans les conditions utilisées. En effet, les chloroplastes sont considérés comme particulièrement sensibles aux rayonnements gamma chez *Arabidopsis* (Wi *et al.* 2007). Après 50 Gy, les auteurs observent des modifications des structures cellulaires : dégradation des thylakoïdes, déformation des mitochondries et de la membrane du réticulum endoplasmique, augmentation de la taille des noyaux et dispersion de la chromatine. Toutefois, les auteurs ont appliqué ce stress sur des plantules de 5 semaines avec des feuilles déjà bien développées contrairement à nos essais qui concernent de très jeunes plantules. L'approche génomique plus sensible, a montré par la suite l'impact des RI sur la photosynthèse.

Les résultats des deux approches de génomique fonctionnelle appliquées dans des conditions similaires ont mis en évidence les effets des RI sur le métabolisme énergétique de la plante (photosynthèse, respiration et photorespiration), sur le métabolisme secondaire (flavonoïdes, GLSs, éthylène), ainsi que sur les systèmes de défense/protection de la plantes (détoxification enzymatique, HSPs, chaperonnes). Certaines des régulations sont susceptibles de constituer des mécanismes de protection ou de défense contre le stress oxydant mis en évidence dans les racines par la détection de ROS à l'aide des sondes spécifiques.

Une partie des voies de biosynthèse ou catégories fonctionnelles répondent aux RI de la même façon dans les deux études globales de génomique (transcriptomique et protéomique). C'est le cas des activités enzymatiques antioxydantes et détoxifiantes qui sont activées immédiatement après la dose 40 Gy. Elles réagissent par ailleurs dans de nombreux stress pour éliminer les ROS générés. Leur importance dans le contexte de fortes doses d'irradiation a été largement documenté (Esnault *et al.* 2010) et mise avant au cours d'une étude de transcriptomique récente chez *A. thaliana* (Kim *et al.* 2011).

Le métabolisme des GLSs apparaît également dans les résultats des deux études. Il est régulé de manière remarquable au niveau des protéines et au niveau des transcripts : la protéomique met plutôt en avant leur hydrolyse en ITCs alors que la transcriptomique met en évidence la stimulation de leur voie de biosynthèse. Ceci confirmerait leur action possible comme antioxydants métaboliques dans la cellule. Cet aspect des GLSs étant déjà fortement soupçonné (*cf* Introduction générale – 3.6.), et pouvant être valorisé dans le cadre du financement de la thèse (valorisation des co-produits de la production des choux par exemple en phytothérapie), le second chapitre s'attachera à étudier plus précisément cette piste.

La régulation de HSPs et de protéines chaperonnes, de gènes relatifs au recyclage des protéines, à la mort cellulaire programmée et à la sénescence, ainsi que la régulation différentielle de la photosynthèse en fonction de la dose (PSII, chaîne de transport des électrons et cycle de Calvin stimulés par la dose 10 Gy alors qu'ils sont plutôt inhibés par la dose 40 Gy) constitue des résultats cohérents qui sont confirmés dans les deux niveaux d'approche.

La régulation du cycle cellulaire après une irradiation à 40 Gy est également confirmée par les deux approches moléculaires. En croisant les données protéomiques et transcriptomiques, il semble que la protéine CDKA ;1, bien que non régulée elle-même, joue un rôle central dans l'arrêt du cycle cellulaire car trois de ses partenaires sont régulés au niveau transcriptomique (KRP6, TON1b et CPN60A ; Van Leene *et al.* 2007). De plus EMB1796, protéine également interagissante avec CDKA ;1, présente des variations significatives dans l'étude de protéomique. CDKA ;1 pourrait ainsi être sujette à un contrôle posttraductionnel de son activité.

Parmi les différences entre les deux approches, la transcriptomique complète la réponse à 10 Gy par production d'antioxydants métaboliques en révélant l'activation de la voie des flavonoïdes qui vient seconder celle des GLSs. La plante semble ainsi lutter contre cette dose faible en forçant légèrement la production de composés antioxydants qu'elle synthétise de façon constitutive (ratios plus faibles). La transcriptomique permet également de visualiser la



répression de la voie de signalisation de l'éthylène à 10 Gy (répression des facteurs de transcription répondant à l'éthylène) et l'effet négatif de 40 Gy sur la croissance et la paroi cellulaire.

D'un autre côté, les résultats de protéomique impliqueraient des enzymes relatives à la respiration et à la photorespiration.

Les différences de résultats obtenues entre les deux études sont liées à la capacité intrinsèque de chacune des techniques. En effet, si les deux approches sont dites « globales », seule la transcriptomique correspond réellement à cette appellation. L'analyse protéomique d'un échantillon étudie en fait un nombre restreint de protéines qui varie en fonction des protocoles d'extraction et de séparation/migration utilisés. Ainsi, Maldonado *et al.* (2008) mettent en évidence une variation de 20% du nombre de protéines détectées sur les gels de 2D-E (coloration Coomassie) entre une extraction TCA-acétone (602) et une extraction TCA-acétone-phénol (736) d'un même échantillon de feuilles d'*A. thaliana*. Giavalisco *et al.* (2003) ont détecté jusqu'à 2500 spots sur des gels 2D-E colorés au nitrate d'argent en utilisant une extraction au tampon sur des feuilles d'*A. thaliana*, et des gels d'électrofocalisation fait à la main de 40 cm de long (diam. 9 mm) et de pH 3 à 10. Certaines colorations plus sensibles que le bleu de Coomassie (nitrate d'argent, colorations négatives, sondes fluorescentes), améliorent la détection des protéines sur les gels 2D-E (Candiano *et al.* 2004) mais ces techniques sont incompatibles avec l'identification subséquente par spectrométrie de masse. Du fait du grand nombre de gels à réaliser en protéomique comparative, la coloration au bleu de Coomassie est la plus utilisée pour sa rapidité et son faible coût. Le nombre de protéines détectées dans les feuilles d'*A. thaliana* sur ce type de gels se situe en général entre 550 et 700 protéines (parfois autour de 1000 dans le cas de cultures cellulaires ; Le Lay *et al.* 2006), ce qui correspond à peine au sixième du protéome foliaire réel estimé à 4853 protéines par spectrométrie de masse à trappe ionique linéaire (Baerenfaller *et al.* 2008).

De plus, ces protéines ne sont pas détectées au hasard mais correspondent à des protéines ayant un nombre de copies abondantes dans l'extrait. Ces protéines, qui apparaissent fréquemment dans les analyses globales de protéomique, sont associées à certaines catégories fonctionnelles, comme par exemple les enzymes (Petraik *et al.* 2008). A contrario, certaines catégories fonctionnelles sont sous-représentées, voire absentes des résultats protéomiques, comme par exemple les facteurs de transcription qui sont présents en très peu de copies dans le génome et dont l'action passe par une amplification dans la voie de signalisation.

Ce phénomène est notamment lié au fait que les protéines présentes en faible nombre de copies sont plus difficiles à identifier. Ainsi, les travaux de Liu *et al.* (2004) sur l'identification des protéines de *Saccharomyces cerevisiae* par chromatographie à deux dimensions et MS/MS montrent que seulement 6,5% des protéines peu abondantes sont identifiées au premier « run » contre 96,3% des protéines abondantes et que huit « run » supplémentaires ne permettent d'identifier que 15,5% de ces protéines peu abondantes.

Les deux types d'études se complètent donc efficacement du fait, d'une part de la perte inévitable de certaines catégories de protéines dans la protéomique (cycle cellulaire, transcription), et d'autre part des régulations opérantes aux deux niveaux. Elles apportent une sensibilité indéniable puisqu'il fallait des doses de l'ordre du kGy pour démontrer certains effets par des méthodes plus traditionnelles, i.e. l'activation de la phénylalanine ammonia lyase impliquée dans la synthèse d'acide trans-cinnamique précurseur de nombreux phénylpropanoïdes dans les bourgeons et le cortex de tubercules de pomme de terre (Pendharkar et Nair, 1975) ou l'accumulation d'éthylène et activation de l'ACC synthase chez la tomate climatérique (Larrigaudière *et al.* 1990). Ces doses étaient très fortes et loin des doses qui peuvent être observées dans le cas d'accident nucléaire ou d'irradiation tellurique par exemple. Il était donc difficile à partir de ces travaux d'extrapoler pour évaluer l'effet de doses beaucoup plus faibles, non létales. Les différences de résultats obtenus à 10 et 40 Gy montrent bien l'importance de maîtriser la dosimétrie pour comprendre l'impact des RI.

*Chapitre 2 : Evaluation des capacités antioxydantes des glucosinolates  
et de leur implication dans la protection des plantes face aux effets pro-  
oxydants des radiations*

---



L'étude de la réponse d'*A. thaliana* aux radiations ionisantes menée dans le premier chapitre de cette thèse a mis en évidence des réponses morphologiques et moléculaires différentes pour les doses 10 Gy et 40 Gy. Les deux approches moléculaires globales ont notamment détecté, parmi les nombreuses régulations métaboliques induites par les radiations ionisantes, une activation des voies de biosynthèse et d'hydrolyse des GLSs dans la réponse à la dose 10 Gy, ce qui suggère un rôle radioprotecteur de ces composés. Cette piste présente un intérêt particulier puisque le financement accordé par la région Bretagne avait un objectif de valorisation des co-produits des cultures de Brassicaceae Bretonnes. Toutefois, *A. thaliana*, comme la plupart des Brassicaceae, contient plusieurs GLSs en proportions variables, ceux-ci appartenant à des familles différentes (aliphatiques, indoles, benzoles) et ayant par conséquent des propriétés différentes. Ainsi, si la glucoraphanine, dont l'hydrolyse enzymatique aboutit au sulforaphane, est très largement étudiée pour ses propriétés anticancéreuses, la progoitrine est *a contrario* largement soupçonnée d'avoir des effets néfastes pour la santé, notamment au niveau de la thyroïde (Holst et Williamson, 2004). Dans ces conditions, nous avons souhaité évaluer la variation de la réponse de la plante aux radiations ionisantes en fonction de la présence et des teneurs en glucosinolates. L'action de ces radiations étant majoritairement liée au stress oxydant, nous avons évalué au préalable la capacité antioxydante des GLSs.

De nombreux travaux ont démontré la capacité antioxydante directe des molécules issues du métabolisme secondaire des plantes par leur capacité à éliminer directement les formes réactives de l'oxygène. C'est notamment le cas des vitamines C et E, des caroténoïdes, des polyphénols et des anthocyanes. Les glucosinolates ont été moins étudiés dans ce contexte (Barillari *et al.* 2005a et b ; Papi *et al.* 2008). Leurs effets antioxydants sont plus souvent considérés comme indirects du fait de leur capacité à moduler les activités des enzymes de phase II (glutathion-S-transferase, aldehyde reductase, S-methyl transferase par exemple) impliquées dans les phénomènes de cancérisation (Fahey et Talahay 1999 ; Valgimigli et Iori 2009 ; Vig *et al.* 2009). De plus, ils concernent plus souvent les dérivés ITCs que les GLSs intacts. Par ailleurs, on leur attribue aussi un effet pro-oxydant (Valgimigli et Iori, 2009). Beaucoup de ces mesures sont réalisées *in vitro*. Dans ce contexte, nous avons donc choisi de déterminer tout d'abord la capacité antioxydante *in vitro* de certains GLSs purs ainsi que de leurs dérivés.

Dans l'hypothèse d'une protection antioxydante de la plante par les GLSs, leur biodisponibilité dans cet organisme complexe est importante afin qu'ils agissent au niveau du site approprié. C'est pourquoi, leur effet sur notre modèle *A. thaliana* a été évalué après

déclenchement d'un puissant stress oxydant tel que celui induit par les radiations ionisantes. La stratégie utilisée a été de deux types :

Dans un premier temps, l'effet protecteur des GLSs *in vivo* par rapport à l'irradiation a été testé par des expériences d'apports exogènes en GLSs dans le milieu de culture de plantules d'*A. thaliana*. De plus, cette espèce étant elle-même productrice de GLSs, son comportement a été comparé à celui d'espèces végétales non productrices de GLSs. Parmi les différentes espèces et variétés végétales disponibles, le pois (*Pisum sativum*, var. Baccara), reconnu pour sa radiosensibilité (Zaka *et al.* 2004), et l'oignon (*Allium cepa*), dont l'Agence Américaine pour la Protection de l'Environnement préconise l'utilisation (U.S.EPA, 1996) pour des tests en écotoxicologie, ont été retenus comme modèles pour effectuer ces expériences.

Dans un second temps, la variété des réponses aux radiations ionisantes a été analysée au travers d'un panel d'écotypes naturels de *A. thaliana*, caractérisés génétiquement du point de vue de la voie de biosynthèse des GLSs et donc à composition variable en GLSs (*cf* Introduction générale – 4.). Pour compléter ces résultats, le comportement de mutants déplétés dans certains gènes de la voie de biosynthèse des GLSs a également fait l'objet d'une étude comparative avec l'écotype sauvage.

## 1. Etude de la capacité antioxydante *in vitro* des glucosinolates

### 1.1. Introduction

Les conclusions issues des deux études de génomique fonctionnelle menées dans le chapitre précédent (études protéomiques et transcriptomiques globales de la réponse d'*A. thaliana* aux RI) suggèrent une implication des GLSs ainsi que de leurs produits d'hydrolyse dans la lutte contre le stress oxydant.

Or il existe un certain nombre de méthodes *in vitro* qui permettent d'évaluer la capacité antioxydante de molécules en solution ou d'extraits végétaux complexes face aux différents radicaux produits (Prior *et al.* 2005). Si certaines de ces méthodes ont déjà été utilisées pour la mise en évidence des activités antioxydantes d'extraits totaux de différentes espèces de Brassica (pour une revue, voir Podsedek 2007), peu de travaux se sont jusqu'alors penchés sur la capacité antioxydante des GLSs purs. Ils sont connus pour être de puissants électrophiles par leur groupement  $-N=C=S$  mais leur action antioxydante serait plutôt en lien avec le groupement de la chaîne latérale (Valgimigli et Iori, 2009). Cette activité directe est toutefois également controversée et le pouvoir antioxydant rapporté pour certains GLSs *in vivo* est imputé à des mécanismes indirects comme l'induction des enzymes de détoxification de phase II.

Ce point de la thèse a donc consisté à évaluer la capacité antioxydante de certains GLSs choisis en fonction de leur abondance dans le chou-fleur compte tenu des enjeux économiques locaux liés à la région Bretagne. L'article « Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective », publié dans le journal « Food Chemistry », rassemble les résultats de cette étude<sup>5</sup>.

### 1.2. Résumé

Les GLSs suscitent l'intérêt de la communauté scientifique pour leur potentiel antioxydant ainsi que pour leurs propriétés en tant qu'agent anti-cancéreux. Nous avons voulu donner à cette étude une dimension de valorisation des productions agricoles de la région Bretagne, et c'est dans ce cadre que le travail relaté ici a pour but de mesurer la capacité antioxydante de GLSs purs majoritaires dans la composition du chou-fleur (la gluconapine, la glucoibérine, la progoïtrine, la sinigrine, la glucoraphanine et la glucobrassicine) ainsi que celle de leurs dérivés obtenus par action de la myrosinase (EHDPs ; *angl.* « enzymatic hydrolysis-derived

---

<sup>5</sup> Cabello-Hurtado F, Gicquel M, Esnault MA. Food chem. 2011;132:1003-1009.

*products* »), afin d'estimer leur contribution par rapport à la capacité antioxydante totale d'extraits végétaux de choux-fleurs. Pour cela, quatre méthodes *in vitro* ont été utilisées. La méthode ABTS<sup>•+</sup> (oxydation du diammonium 2,2'-azino-bis(3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonate)) et la méthode DPPH<sup>•</sup> (réduction du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl par un antioxydant) mesurent la capacité pour un antioxydant à quencher les radicaux libres par le transfert d'un électron majoritairement. Dans la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), ils agissent comme donneur d'hydrogène. Enfin, la méthode SRSA (Superoxide Radical Scavenging Activity) est spécifique du radical superoxyde. Pour chacune, le potentiel antioxydant a été calculé en équivalent Trolox (dérivé de la vitamine E soluble dans l'eau) qui représente le nombre de micromoles de Trolox requis pour obtenir le même effet. De plus, l'acide ascorbique et le glutathion ont été testés en parallèle pour servir d'antioxydants de référence.

Les résultats obtenus dépendent largement de la méthode utilisée. Les méthodes ABTS<sup>•+</sup> et DPPH<sup>•</sup>, basées sur des principes identiques, ne montrent aucune activité anti-oxydante pour tous les GLSs à l'exception de la glucoibérine. Avec l'ABTS<sup>•+</sup>, cette activité est dix fois plus faible (0,13 équivalent Trolox) que celle du glutathion (0,98) et de l'ascorbate (1,31). Au contraire, les méthodes ORAC et SRSA ont démontré des activités antioxydantes significatives des GLSs. Ces activités sont particulièrement importantes pour la glucobrassicine, le seul GLS indolique testé et le plus actif dans les deux méthodes, avec un équivalent Trolox de 2,9 pour l'ORAC. La glucoibérine (0,187) et la gluconapine (0,157) possèdent une activité équivalente à celles du glutathion (0,167) et de l'ascorbate (0,17). En combinant divers GLS d'activité variable, il a été montré que lorsqu'ils sont en mélange, l'activité antioxydante du mélange se résume globalement à une moyenne mathématique des activités de chacun d'entre eux. Il n'y a pas d'effet de synergie et un seul effet d'antagonisme a pu être mis en évidence entre la progoïtrine et la glucobrassicine.

Les dérivés des glucosinolates (EHDPs) obtenus après une hydrolyse par la myrosinase possèdent des activités antioxydantes mesurées par la méthode ORAC bien plus importantes que les GLSs dont ils étaient issus, l'augmentation pouvant aller de 10% (glucobrassicine) à 385% pour la progoïtrine. A pH 6,5 qui est celui utilisé lors de l'hydrolyse, les isothiocyanates (ITC) seraient les produits majoritairement obtenus (Holst et Williamson, 2004 ; Vaughn et Berhow, 2005). Ces résultats confirment l'opinion généralement admise de l'activité supérieure des ITCs par rapport aux GLSs intacts. Pour Valgimigli et Iori (2009), les chaînes latérales étant peu modifiées entre le GLS et l'ITC, on peut s'attendre à ce que l'ITC



soit actif si le GLS l'est et inversement. Nos résultats montrent que la relation n'est pas toujours aussi simple.

Les activités antioxydantes d'extraits de différents co-produits de choux-fleurs a également été déterminée par les méthodes ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup> et ORAC. La composition en GLSs de ces extraits ayant été analysée, la contribution des différents GLSs dans la capacité antioxydante totale a pu être discutée par rapport à une valeur théorique attendue compte tenu de la teneur en chaque GLS et de son activité antioxydante. Il est ainsi apparu que les GLSs ne contribuent que très peu (environ 2%) à la capacité antioxydante *in vitro* des extraits de choux-fleurs. Les travaux des auteurs ont montré que ceux-ci contiennent également des composés de natures différentes, tels que les flavonoïdes, les dérivés de l'acide hydroxycinnamique ou la vitamine C qui contribue sans doute largement à la valeur de la capacité antioxydante des choux compte tenu de sa teneur élevée. Par ailleurs, des effets de synergie entre des molécules de nature différente ne sont pas exclus dans ces extraits complexes.

***1.3. Article : « Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective »***





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective

Francisco Cabello-Hurtado, Morgane Gicquel, Marie-Andrée Esnault \*

UMR 6553 Ecobio, Université de Rennes1, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 July 2011

Received in revised form 5 October 2011

Accepted 16 November 2011

Available online 25 November 2011

#### Keywords:

Glucosinolates

Glucosinolate derivatives

Isothiocyanates

Cauliflower

Antioxidant

ORAC

### ABSTRACT

Glucosinolates (GLSs) are of great interest for their potential as antioxidant and anticancer agents. Our aim was to assess *in vitro* antioxidant activity of cauliflower GLSs and their derivatives, as well as to evaluate their contribution to the overall antioxidant capacity of cauliflower extracts using four different *in vitro* assays, 2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation (ABTS<sup>+</sup>), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH<sup>•</sup>), oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC) and superoxide radical scavenging activity assay (SRSA). The antioxidant activities of GLSs determined using ABTS<sup>+</sup> and DPPH<sup>•</sup> assays were weak. In contrast, ORAC and SRSA assays showed significant antioxidant activity for GLSs. This activity was particularly important for glucobrassicin, which was the most effective GLS, and for glucoiberin and gluconapin. Mixtures of GLSs did not show either synergy or antagonism in general. Interestingly, the breakdown products, i.e. enzymatic hydrolysis-derived products (EHDP) of GLSs, were far more active than the native GLSs. The highest increases in antioxidant activity were obtained for EHDPs from progoitrin, sinigrin and glucoraphanin; progoitrin EHDP being the second most active derivative behind glucobrassicin EHDP. Antioxidant activities and GLS composition of different cauliflower by-product extracts were also determined. The contribution of different GLSs on measured antioxidant activity of cauliflower extracts was also discussed.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Brassica vegetables are a group of agriculturally important species that are very important in human nutrition, as they are the predominant dietary source of glucosinolates (GLSs). The *Brassica oleracea* species, various cultivars of which are among the most popular food crops, are an important source of vegetables in many countries, and plenty of studies have examined the contents and properties of their glucosinolates (GLSs) (Cartea & Velasco, 2008). GLSs are a major group of natural plant compounds that are mainly present in Brassicaceae of the order Capparales. They are  $\beta$ -thioglucosides derived from amino acids with a basic structure that consists of a  $\beta$ -thioglucosyl linked to the  $\alpha$  carbon of the amino acid to form a sulphated aldoxime (Halkier & Gershenson, 2006). Upon cellular disruption, glucosinolates are hydrolysed by the myrosinase action to various bioactive breakdown products (isothiocyanates, nitriles, thiocyanates, epithionitriles, and oxazolidines).

Brassica extracts are reported to possess cancer preventive activity and antioxidant capacities (Cartea & Velasco, 2008). The anticarcinogenic properties of Brassica vegetables have mainly been ascribed to the hydrolytic products rather than to the intact

glucosinolates. Most of these studies have focused on sulphoraphane and indole-3-carbinol (I3C), two isothiocyanates derived from abundant broccoli GLSs (glucoraphanin and glucobrassicin, respectively), or 3,3'-diindolylmethane, a major digestive product of I3C, all of which have been shown to inhibit the growth of cancer cells (Cartea & Velasco, 2008; Moiseeva, Almeida, Jones, & Manson, 2007). Glucosinolate hydrolysis products from glucoiberin, sinigrin, and progoitrin have also been reported to possess anticancer effects (Cartea & Velasco, 2008).

In addition, the antioxidant activities of *Brassica* species have also been established (Podszędek, 2007). These antioxidant properties are likely to have considerable impacts in the field of nutraceuticals as well as applications in the food processing industry. Most studies on the antioxidant effects of *Brassica* are directly related to the total extracts, without considering the contributions of individual molecules (Kurilich, Jeffery, Juvik, Wallig, & Klein, 2002; Kuznierewicz et al., 2008; Podszędek, 2007; Podszędek, Sosnowska, Redzyna, & Anders, 2006), although various compounds, such as polyphenols (Khähkönen et al., 1999), 1,2-disinapoylgentiobiose and 1-sinapoyl 2-feruloyl-gentiobiose (Piao et al., 2005) or hydroxycinnamic acid and vitamin C (Ferrerres et al., 2007), have been linked to antioxidant activity in *B. oleracea* extracts. However, data on antioxidant activities of the abundant GLSs and their derivatives in *B. oleracea* are scarce. Although they are known to

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 23 23 51 13; fax: +33 2 23 23 50 47.

E-mail address: [marie-andree.esnault@univ-rennes1.fr](mailto:marie-andree.esnault@univ-rennes1.fr) (M.-A. Esnault).

be powerful electrophiles through their  $-N=C=S$  group, the direct antioxidant action of GLSs is controversial, and the *in vivo* antioxidant action of some GLSs has been ascribed to indirect mechanisms such as their effect on phase II enzymes involved in carcinogenesis (Fahey & Talalay, 1999; Valgimigli & Iori, 2009). Barillari et al. (2005) demonstrated direct and indirect antioxidant properties of glucoerucin, the major GLS of rocket (*Eruca sativa*), and of its isothiocyanate derivative, erucin. In radish (*Raphanus sativus* L.), glucoraphasatin, the major GLS, showed reducing potential (Papi et al., 2008). Interestingly, some Brassicaceae GLS breakdown products have also been reported to have direct antioxidant capacities (Valgimigli & Iori, 2009).

Considering the great interest in nutraceuticals and their dietary contribution to human health, it is important to evaluate the particular antioxidant capacities of widely consumed natural compounds such as GLSs. The main objective of the present study was to evaluate the antioxidant activities of *Brassica* GLSs and their breakdown products. The antioxidant activities of the main pure GLSs present in cauliflower and their derivatives, obtained by action of myrosinase, were investigated using four antioxidant assays. Our approach focuses on *in vitro* studies, without examining possible effects *in vivo*, because the bioactivities of these compounds are very complex and determining their *in vivo* properties would require different approaches. We also investigated the possibility of synergy and antagonism between the GLSs with regard to antioxidant activity and evaluated the contribution of GLSs in the antioxidant capacity of cauliflower extracts.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Determination of antioxidant capacity

Antioxidant capacity was determined by complementary radical scavenging assays belonging to different mechanisms because multiple reactions are involved in complex natural extracts (Prior et al., 2005). The different methods measure the ability of an antioxidant to quench free radicals by hydrogen atom transfer (ORAC) or single electron transfer ( $ABTS^+$  or  $DPPH^{\cdot}$ ), and SRSA is specific of superoxide radical. In all cases, the antioxidant potential was calculated as Trolox equivalent (TE), which represents the number of micromoles of Trolox that is required to produce the same effect as either one micromole of a chemical or one gram dry weight of plant material. Ascorbic acid and reduced glutathione were used as antioxidant references.

The GLSs were selected based on their abundance as major glucosinolates of cauliflower (Volden, Borge, Hansen, Wicklund, & Bengtsson, 2009) and their commercial availability. Sinigrin was obtained from Sigma–Aldrich; gluconapin, glucoiberin, progoitrin, and glucoraphanin were obtained from C2 Bioengineering; and glucobrassicin was obtained from Phytoflan.

#### 2.1.1. $ABTS^+$ assay

This assay is based on the reduction of the  $ABTS^+$  (2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid) radical by antioxidants and was performed as described by Re et al. (1999). This radical was chemically generated using potassium persulphate as described by the authors and diluted to an absorbance of 0.7 at 734 nm. The assay was adapted for spectrophotometric measurements in 96-well microplates, 290  $\mu$ l of the  $ABTS^+$  solution and 10  $\mu$ l of antioxidant solution or cauliflower extract were used for each reaction, and the absorbance was measured at 734 nm (Molecular Devices spectrophotometer, Softmax Pro software). GLSs, vitamin C and glutathione were dissolved in water to final concentrations ranging from 0 to 200  $\mu$ M. Cauliflower extracts represented 0 to 83  $\mu$ g dry weight (DW) per well. The percentage decrease in the absorbance

in the presence of antioxidant or cauliflower extract was plotted as a function of the antioxidant concentration.

#### 2.1.2. $DPPH^{\cdot}$ assay

The assay is based on a colour change (from violet to yellow) of  $DPPH^{\cdot}$  (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), which is a stable organic nitrogen radical. The reaction mixtures in the 96-well microplates consisted of 10  $\mu$ l of antioxidant solution or cauliflower extract and 290  $\mu$ l of  $DPPH^{\cdot}$  dissolved in methanol (final concentration of 60  $\mu$ M). The decrease in absorbance in the presence of an antioxidant was followed at 515 nm as described by Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995).

#### 2.1.3. ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay

The ORAC assay measures the antioxidant scavenging capacity against peroxyl radicals originating from AAPH (2,2'-azobis[2-amidinopropane] dihydrochloride). It was carried out using a spectrofluorometric analyser (Synergy2, BioTek Instruments) in a 96-well microplate with fluorescein as a fluorescent probe following the protocol of Ou, Hampsch-Woodill, and Prior (2001). All solutions were prepared in phosphate buffer (75 mM, pH 7.4). Briefly, 20  $\mu$ l of the sample (test compound or cauliflower extract) was mixed with 180  $\mu$ l of 70 nM disodium fluorescein in a microplate and incubated at 37 °C. Afterwards, 100  $\mu$ l of AAPH preincubated at 37 °C was added to initiate the reaction. Fluorescence was recorded every minute thereafter for a duration of 2 h ( $\lambda$  excitation: 485 nm;  $\lambda$  emission: 528 nm). The antioxidant solution concentrations varied from 0 to 20  $\mu$ M and the cauliflower extracts from 0 to 3  $\mu$ g DW. The net AUC (area under the curve) was calculated by subtracting the AUC obtained in presence of an antioxidant to the AUC of the blank. Finally, the net AUC was plotted as a function of the antioxidant concentration. The Trolox equivalent was calculated from the linear portion of the curve.

#### 2.1.4. SRSA (superoxide radical scavenging activity) assay

Antiradical activity was determined according to Valentão et al. (2001) by following the reduction of NBT to formazan by  $O_2^{\cdot-}$  at 560 nm in a 96-well microplate (Molecular Devices, Softmax Pro). Data analysis was similar to the  $ABTS^+$  and  $DPPH^{\cdot}$  assays.

#### 2.1.5. Expression of antioxidant activity

All experiments were performed in triplicate. In addition, calibration curves were made for each assay using Trolox as a standard. The antioxidant activity ( $ABTS^+$ ,  $DPPH^{\cdot}$ , ORAC, SRSA) was expressed as TE. The TE was calculated from the linear part of antioxidant activity versus the antioxidant concentration plots. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (standard error of the mean). Statistical analyses were performed with R free software version 2.7.1 (<http://www.r-project.org/>). Normality and homoscedasticity were tested with Shapiro and Bartlett tests for each assay. Both assumptions were satisfied for the SRSA assay only. Consequently, for SRSA assay differences between means were evaluated for significance by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. For  $ABTS^+$ ,  $DPPH^{\cdot}$ , and ORAC, differences between means were evaluated for significance by Kruskal–Wallis and Holm–Bonferroni method for multiple comparisons, and Welch test ( $/p/ < 0.05$ ) for pairwise comparison between GLSs and their derivatives. Statistical significance was accepted when  $/p/ < 0.05$ . The significance of differences between mean values was determined by one-way analysis of variance. When the main effect was significant ( $P < 0.05$ ), differences between means were evaluated for significance by Tukey's test.

### 2.2. Production of EHDPs (enzymatic hydrolysis-derived products)

EHDPs were produced from GLSs using free myrosinase (0.274 units) in 50 mM phosphate buffer (pH 6.5) at 37 °C (Nast-

ruzzi et al., 1996). Isothiocyanates have been reported to be the main products obtained at pH 6.5 (Vaughn & Berhow, 2005). Myrosinase was obtained from Sigma–Aldrich (thioglucosidase from *Sinapis alba* seed). The development of a hydrolysis reaction was performed using sinigrin. One myrosinase unit is defined as the amount of enzyme able to hydrolyse 1  $\mu\text{mol}$  of sinigrin per min. The decrease in sinigrin absorbance was monitored at 227 nm for protocol tests and kinetic controls (final concentration 25.9  $\mu\text{M}$ ). Hydrolysis was monitored by measuring absorbance spectra every 15 min for 90 min. As we observed complete hydrolysis of sinigrin after 30 min, 45 min of hydrolysis used for routine assays.

EHDP antioxidant activities were determined immediately after the end of the hydrolysis reaction. For these experiments, hydrolysate was heated at 100 °C for 3 min and then put on ice to inhibit myrosinase and to avoid interference with the antioxidant activity assay. Three independent experiments were carried out and controls were made using myrosinase alone. The hydrolysates were diluted to be in the range of concentrations corresponding to the linear part of the curve representing the activity plotted as a function of the antioxidant concentration. This linear relationship was established for each hydrolysate. Hydrolysates obtained from GLS concentrations ranging from 0 to 20  $\mu\text{M}$  were used in ORAC assays as for native GLSs. All assays were performed in triplicate.

### 2.3. Extraction of glucosinolates from cauliflower

To quantify GLSs in cauliflower by-products, plant material was obtained from local production (Saint Pol de Leon, France). It mainly consisted of leaves and, to a lesser extent, stalks from non-edible portion of cauliflower cultures. Plant material was immediately frozen after harvest and lyophilised. First, myrosinase was inhibited by heating dry material at 100 °C for 15 min. Then, GLSs were extracted, either in sterile boiling water (twice in 2 ml and 1 ml from 200 mg DW) for GLS quantification or in 70 °C methanol (1.5 ml, 100 mg DW) for antioxidant capacity measurements. For GLS quantification, the extraction was performed in duplicate, and we performed two HPLC analyses per extraction. To measure the antioxidant activity, extracts for three independent samples were prepared, and the antioxidant assays were repeated in triplicate on each extract. The antioxidant capacity of pure GLS was expressed as TE per gram of dry weight.

### 2.4. Quantification of glucosinolates from cauliflower extracts

For quantification, desulphoglucosinolates were obtained in agreement with the ISO 9167-1: 1992(F) European method, which was slightly modified according to Kushad et al. (1999) for the extraction and Kiddle et al. (2001) for the HPLC gradient. Briefly, a 20  $\mu\text{l}$  aliquot of glucotropaeolin (2-propenyl glucosinolate, allyl glucosinolate, 5 mM) was added as an internal standard at the

initiation of the extraction procedure. The boiled extract was applied to an anion-exchange column (DEAE-Sephadex A-25) that had been equilibrated in 2 M acetic acid and washed with water. Desulphoglucosinolates were obtained by an 18 h treatment at room temperature with 14.4 U  $\text{ml}^{-1}$  *Helix Pomatia* sulphatase (EC 3.1.6.1) that had been dissolved in sterile water, followed by elution in 2 ml water. The samples were separated by HPLC using a Waters 2695 separation module equipped with a RP-18 Lichrospher column (LichroCART 250-4, Merck) and detected at 229 nm with a 996 photodiode array detector (Waters, Milford, MA) at a flow-rate of 1.5  $\text{ml min}^{-1}$  (Merck, Darmstadt, Germany). The desulphoglucosinolates were eluted using the following protocol: a linear gradient of 0–4% acetonitrile (5 min), a linear gradient of 4–40% acetonitrile (25 min) and 100% of acetonitrile (5 min). The GLSs were identified by (1) a comparison with the retention time of the pure compounds injected in the same conditions and (2) their UV spectra. HPLC-mass spectrometry (MS) data were used to confirm the identification of some of the compounds.

## 3. Results

### 3.1. Antioxidant activity of native GLS

We first measured the antioxidant activity of the main cauliflower GLSs. Five of these (i.e. gluconapin, glucoiberin, progoitrin, sinigrin, and glucoraphanin) belong to the largest group of GLSs, the aliphatic group, whose side chains are derived from methionine. Glucobrassicin belongs to the indole group of GLSs, whose side chains are derived from tryptophan.

The measured antioxidant activity of GLSs was highly dependent on the antioxidant assay used. ABTS<sup>+</sup> assay gave low TE values for all of the six GLS analysed (Table 1), with a high value of 0.13 TE for glucoiberin. Ascorbic acid (0.98) and glutathione (1.31) activity, however, were nearly equivalent to Trolox (1.00). Likewise, the DPPH<sup>•</sup> method did not demonstrate antioxidant activity for GLSs compared with references. However, unlike the ABTS<sup>+</sup> assay, the DPPH<sup>•</sup> assay showed weak TE values for vitamin C and glutathione. In contrast to the ABTS<sup>+</sup> or DPPH<sup>•</sup> assays, the ORAC assay was extremely sensitive. For Trolox and glucobrassicin, the linear range was under 4  $\mu\text{M}$ , compared to 20  $\mu\text{M}$  for other assays (Supplementary data). The antioxidant activity values of GLSs determined by ORAC assay were quite interesting. Gluconapin (0.157) and glucoiberin (0.187) had a TE values close to that of ascorbic acid (0.170) and glutathione (0.168). The highest antioxidant capacity was for glucobrassicin, with a TE of 2.9. The lowest ORAC TE values were for progoitrin, sinigrin, and glucoraphanin, which is one of the most studied GLSs.

The SRSA method measured the scavenging activity of glucosinolates for superoxide ions. Again, glucobrassicin had the highest SRSA rating (TE of 0.811), which is consistent with its ORAC value.

**Table 1**

Antioxidant capacity of glucosinolates, their corresponding enzymatic hydrolysis-derived products (ORAC of EHDPs) and antioxidative references ( $n=3$ ). The results are expressed as Trolox equivalents (mean  $\pm$  SEM) which represent the number of micromoles of Trolox producing the same effect that one micromole of compound.

	ABTS <sup>++</sup>	DPPH <sup>•</sup>	SRSA	ORAC	ORAC of EHDPs
Ascorbic acid	0.98 $\pm$ 0.02 b	0.195 $\pm$ 0.003 a	0.537 $\pm$ 0.051 ab	0.170 $\pm$ 0.001 bc	–
Glutathione	1.30 $\pm$ 0.11 a	0.018 $\pm$ 0.027 b	0.144 $\pm$ 0.008 c	0.168 $\pm$ 0.001 c	–
Gluconapin	0.08 $\pm$ 0.03 c	0.018 $\pm$ 0.001 b	0.673 $\pm$ 0.111 a	0.157 $\pm$ 0.006 c	0.214 $\pm$ 0.005**
Glucoiberin	0.13 $\pm$ 0.01 c	0.026 $\pm$ 0.001 b	0.591 $\pm$ 0.038 ab	0.187 $\pm$ 0.014 b	0.278 $\pm$ 0.005**
Progoitrin	0.05 $\pm$ 0.02 c	0.011 $\pm$ 0.003 b	0.354 $\pm$ 0.004 bc	0.092 $\pm$ 0.005 d	0.354 $\pm$ 0.007**
Glucoraphanin	0.04 $\pm$ 0.01 c	0.013 $\pm$ 0.002 b	0.634 $\pm$ 0.007 ab	0.100 $\pm$ 0.001 d	0.154 $\pm$ 0.003**
Glucobrassicin	0.040 $\pm$ 0.001 c	0.013 $\pm$ 0.005 b	0.811 $\pm$ 0.037 a	2.900 $\pm$ 0.016 a	3.172 $\pm$ 0.073*
Sinigrin	NA c	NA b	0.464 $\pm$ 0.040 b	0.026 $\pm$ 0.001 e	0.073 $\pm$ 0.001*

NA: no activity.

They are no significant differences among values marked with the same letters in each column ( $p < 0.05$ ).

Values of EHDPs are significantly different compared with GLSs in ORAC assay (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

**Table 2**  
Antioxidant capacity (TE for ORAC) for different mixture of GLS (mean  $\pm$  SEM).

Antioxidants	Characteristics	TE (ORAC)	TE blend/theoretical TE** (%)
Glucoiberin + Gluconapin	2 weak antioxidants*	0.139 $\pm$ 0.003	81
Glucoiberin + Sinigrin	1 weak antioxidant 1 not antioxidant	0.090 $\pm$ 0.006	85
Gluconapin + Sinigrin	1 weak antioxidant 1 not antioxidant	0.086 $\pm$ 0.016	94
Glucoiberin + Glucoraphanin	2 weak antioxidants	0.111 $\pm$ 0.009	78
Glucobrassicin + Glucoiberin	1 strong antioxidant 1 weak antioxidant	1.21 $\pm$ 0.011	78
Glucobrassicin + Gluconapin	1 strong antioxidant 1 weak antioxidant	1.2 $\pm$ 0.016	79
Glucobrassicin + Progoitrin	1 strong antioxidant 1 not antioxidant	0.47 $\pm$ 0.001	31
Glucobrassicin + Glucoiberin + Gluconapin + Progoitrin	1 strong antioxidant 1 weak antioxidant 1 weak antioxidant 1 not antioxidant	0.348 $\pm$ 0.008	42

\* On the basis of the former results, GLS with ORAC value between 0.1 and 0.2 were defined as weak antioxidant, and GLS with ORAC value lower than 0.1 were considered with no antioxidant activity.

\*\* Ratio (%) of TE of the blend to theoretical TE, the latter calculated as an average of the TE obtained for each GLS (Table 1).

**Table 3**  
GLS composition of the three extracts of cauliflower by-products obtained from local agricultural production ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ).

	Sample 1			Sample 2			Sample 3		
	$\mu\text{mol g}^{-1}$	SEM $10^{-2}$	%	$\mu\text{mol g}^{-1}$	SEM $10^{-2}$	%	$\mu\text{mol g}^{-1}$	SEM $10^{-2}$	%
Sinigrin	6.00	5.7	34.46	5.26	39.3	34.00	4.91	49.1	30.86
Glucoiberin	5.65	5.3	32.45	3.91	25.3	25.27	4.73	23.1	29.73
Glucobrassicin	2.23	3.3	12.81	2.42	9.3	15.64	1.26	26.4	7.92
Progoitrin	0.77	4.0	4.42	1.05	3.3	6.79	1.29	3.1	8.11
Glucobrassicinapin	0.76	11.6	4.37	0.70	45.8	4.52	1.14	4.2	7.17
Gluconapin	0.65	0.2	3.73	0.96	8.6	6.21	1.09	2.3	6.85
Neoglucobrassicin	0.72	6.5	4.14	0.44	4.6	2.84	0.50	0.3	3.14
Gluconasturtiin	0.36	9.8	2.07	0.42	0.07	2.71	0.69	21.6	4.34
4-Methoxyglucobrassicin	0.22	0.04	1.26	0.24	0.4	1.55	0.28	1.0	1.76
4-OH-Glucobrassicin	0.05	0.3	0.29	0.07	0.8	0.45	0.02	1.8	0.13
Total	17.41			15.47			15.91		

The TE values of other GLSs were also superior to that of glutathione (0.144).

Another important aspect to consider when evaluating antioxidant capacities of complex natural products is the interaction (synergy or antagonism) between individual compounds present in the vegetable. Therefore, we compared the antioxidant activity of blended glucosinolates to that of the separate molecules. This study was performed using the ORAC assay method, which was the most sensitive for the antioxidant capacity of GLSs. Different mixtures were tested to combine moderately active and low activity GLSs (Tables 1 and 2). Overall, the antioxidant activity values obtained for mixtures tended to correspond to the average of the values obtained for each molecule. Thus, combination of two GLSs with similar activity, i.e. glucoiberin (0.187) and gluconapin (0.157), gave a close TE value (0.139) for the mixture (81% of the theoretical TE). The combination of inactive sinigrin with either glucoiberin or gluconapin reduced the TE of the mixture to half that of the active GLS alone. In mixtures with the highly active glucobrassicin (2.9), the activity of the mixture was reduced in all cases by the addition of a less active glucosinolate. The exceptions to the additive (non-interactive) effect of GLSs were combinations with progoitrin, in the TE for the mixtures were only 31% or 42% of the theoretical values. This could represent an antagonist effect between progoitrin and glucobrassicin.

### 3.2. Enzymatic hydrolysis-derived products (EHDPs) activity

GLS breakdown products are considered to cause the biological effects of the phytochemical group, while the intact GLS are relatively inactive. Damaging plant cellular tissue by handling, processing, or chewing allows for the interaction between

myrosinases and GLSs, which generate breakdown products. Therefore, we next evaluated differences in *in vitro* antioxidant capacity of the intact molecules versus breakdown products following enzymatic hydrolysis using a thioglucosidase (myrosinase). At pH 6.5, the major hydrolysis products are ITCs (Holst & Williamson, 2004). Antioxidant capacities were assessed immediately after hydrolysis arrest and were compared with those of the corresponding native GLSs.

Antioxidant capacity was again evaluated using the ORAC assay. Overall, the EHDPs had higher antioxidant activities than native GLSs (Table 1). The increase was the most significant for progoitrin and sinigrin, whose TE values increased 3.85 and 2.81-fold, respectively, although antioxidant capacity of sinigrin EHDP was still very low. The activities of EHDPs of glucoraphanin, glucoiberin, gluconapin, and glucobrassicin were slightly, but significantly enhanced (54.0%, 48.7%, 36.3%, and 9.4%, respectively).

### 3.3. GLS composition and antioxidant activity of cauliflower extracts

The relative contributions of glucosinolates to the total antioxidant activity of cauliflower extracts were then assessed. Many papers report the occurrence and concentration variability of GLS according to environmental factors such as climatic conditions. The GLS concentrations of three samples of local by-products (leaves and stalks) were characterised (Table 3) and their antioxidant activity was assessed (Table 4). Glucosinolate content and composition were similar in all three samples. The main GLSs were sinigrin (average of 5.39  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) and glucoiberin (4.76), followed by glucobrassicin (1.97). These three GLSs represented, on average, approximately 74% of the total GLSs (33%, 29%, and 12%, respectively). Of the six major cauliflower glucosinolates that were

**Table 4**

Antioxidant capacity of the three cauliflower by-product samples. The experimental data were expressed as  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  DW. Theoretical value of antioxidant capacity was calculated with the TE obtained in Table 1 and GLS content from Table 4. The percent represent the contribution of GLS to the total antioxidant capacity of the cauliflower extracts.

	Sample 1			Sample 2			Sample 3		
	Experimental data	Theoretical GLS contribution		Experimental data	Theoretical GLS contribution		Experimental data	Theoretical GLS contribution	
	TE	TE	%	TE	TE	%	TE	TE	%
ABTS <sup>+</sup>	54 ± 14	0.91	1.7	76 ± 7.8	0.73	0.97	58 ± 1.4	0.82	1.41
DPPH <sup>·</sup>	99 ± 17	0.17	0.17	76 ± 12	0.15	0.19	83 ± 20	0.13	0.16
ORAC	398 ± 63	7.85	1.97	920 ± 21	8.13	0.88	786 ± 34	4.95	0.63

analysed for antioxidant activity, only glucoraphanin was not detected in these samples.

The antioxidant activities of these three extracts were evaluated by the ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>·</sup> and ORAC methods (Table 4). The ORAC method provided a higher activity of samples 2 and 3, while the differences between ABTS<sup>+</sup> and DPPH<sup>·</sup> measurements were not significant. To check the contribution of GLSs to the antioxidant activity of the three cauliflower extracts, we estimated the expected TE for extracts based solely on their glucosinolate composition. GLSs present in these extracts and for which we have TE values, i.e. sinigrin, glucoiberin, glucobrassicin, progoitrin, and gluconapin represented around 86% of total GLSs. We took into account their contents and individual TE values and calculated a theoretical antioxidant activity based on these GLSs in the three extracts. The values obtained showed that they represented only a small per cent of the total antioxidant activity (Table 4). The maximum contribution that could be attributed to GLS was around 2% (sample 1 with ORAC). Although this result is probably an underestimation, glucosinolates could be considered as contributing only a small part to the total antioxidant activity of these extracts.

#### 4. Discussion and conclusion

The total antioxidant activities of GLSs measured by DPPH<sup>·</sup> and ABTS<sup>+</sup> assays were weak, with TE values below 0.03. Only glucoiberin and gluconapin had high TE values in the ABTS<sup>+</sup> assay (0.13 and 0.08). On the other hand, the ORAC and SRSA assays demonstrated significant activity for most of the GLSs tested, with the highest TE obtained for glucobrassicin (2.9) using the ORAC assay, and antioxidant activities for the other GLSs comparable or even higher than those of antioxidant references such as ascorbic acid and glutathione (Table 1). Previous studies have shown that the ABTS<sup>+</sup> assay probably underestimates the antioxidant capacity, and that many antioxidants probably react slowly or not at all due to steric inaccessibility in the DPPH<sup>·</sup> assay (Prior, Wu, & Schlich, 2005). Thus, Barillari et al. (2005) found no appreciable activity for glucoraphenin and gluconapin in the ABTS<sup>+</sup> assay. Interestingly, the ORAC and SRSA assays are considered to be the most biologically relevant assays as they reflect the radical chain breaking induced by oxidation and antioxidant capacity against the superoxide ion, respectively. However, these methods have never been assessed to determine GLS antioxidant activity. To explain the antioxidant capacities of GLSs, some authors have proposed that the sulphur atom in the methylthio group present in the side chain of some GLSs can act as an electron donor, switching from a reduced form (the sulphide group CH<sub>3</sub>-S), to an oxidised form (the sulphinyl group CH<sub>3</sub>-S=O), thus generating redox pairs, e.g., glucorucin/glucoiberin in rocket; glucoraphasatin/glucoiberin in radish (Barillari et al., 2005; Papi et al., 2008). However, Valgimigli and Iori (2009) propose that although the alkyl isothiocyanates bearing this reduced sulphur in the side chain could potentially have antioxidant capacities, this reaction is probably too slow *in vivo*. In this study, the sulphur atom was present only in the

sulphinyl group of glucoiberin (3-methylsulphinyl propyl) and glucoraphanin, indicating that the described antioxidant activities (Table 1) must be due to other structural aspects. Glucobrassicin, which presented the highest antioxidant activities in our study, belongs to indole glucosinolates, which are known antioxidants (Süzen, 2007). This result is consistent with our determined ORAC and SRSA values. Also, following the opinion of Stratil, Klejdus, and Kuban (2006), we conclude that the antioxidant activity of GLSs cannot be attributed to a single structural cause and that the results obtained from each method and molecule are complex.

The effects of the interactions between individual GLSs on antioxidant activities were also evaluated. When combined, the mixture of most GLSs gives values for antioxidant activity that correspond to the mathematical average of the values obtained for the single molecules alone. Notably, this finding corresponds to a GLS concentration range presenting a linear relation between antioxidant activity and GLS concentration. In general, we found little synergy or antagonism between the GLSs used. However, progoitrin and glucobrassicin seemed to interact antagonistically. One explanation could be due to known undesirable properties of progoitrin (Holst & Williamson, 2004), but additional tests would be needed to fully explain this result.

Many papers have reported the antioxidant activities of ITC, which is the subject of many patents (Valgimigli & Iori, 2009). The ITC of glucoraphasatin is about 3 times more reactive than the native GLS (Papi et al., 2008). Plumb et al. (1996) also found higher scavenging activity against lipid peroxidation for gluconapin after myrosinase-catalysed breakdown. For sinalbin and glucoiberin, however, myrosinase treatment did not affect antioxidant activity. Our results demonstrate that the breakdown of most GLSs to EHDPs gave significant increases in antioxidant activity, with the highest increases seen for progoitrin, sinigrin and glucoraphanin. Progoitrin EHDP increased to become the second most active derivative besides glucobrassicin EHDP. Notably, considering the hydrolytic method used in this experiment, EHDPs must be mainly composed of ITCs (Holst & Williamson, 2004).

The by-product extracts have a GLS composition qualitatively similar to that described by Volden et al. (2009) for the florets of white cauliflower, but the levels of components differ. Glucobrassicin (29–30% of the total GLS), glucoiberin (12–43%) and progoitrin (16–37%) are the main GLSs in florets (Volden et al., 2009). However, in the by-products, sinigrin (34–50%) and glucoiberin (30–32%) and, to a lesser extent, glucobrassicin (7–12%) are predominant. The results obtained for by-product contents were quite close to those of locally harvested florets (our own results). This discrepancy could be due to varietal differences. Elsewhere, GLS composition was reported to be highly dependent on environmental factors as well as plant age and origin (Fahey, Zalcmann, & Talahay, 2001).

The antioxidant activities of cauliflower by-product extracts were considerable (Table 4) and similar to those previously described for edible parts of cauliflower. The antioxidant activities of cauliflower extracts have been studied by several groups, who have attempted to identify the compounds responsible for antioxidant activity (Ferrerres et al., 2007; Heimler, Vignolini, Dini, Vinci-

eri, & Romani, 2006; Khäkönen et al., 1999; Kurilich et al., 2002; Llorach, Espin, Tomas-Barberán, & Ferreres, 2003; Podszędek et al., 2006). Khäkönen et al. (1999) showed a strong correlation between antioxidant activity and polyphenol content in edible and non-edible plant materials, and Llorach et al. (2003) reported similar findings for cauliflower by-products. Kurilich et al. (2002) found that lutein and zeaxanthin contributed to the antioxidant capacity of the lipophilic extract of broccoli, and Piao et al. (2005) showed an antioxidant role for 1,2-disinapoylgentiobiose and 1-sinapoyl-2-feruloylgentiobiose in broccoli extracts. Ferreres et al. (2007) proposed that the antioxidant activity in the seeds of cabbage (*B. oleracea* L. var. *costata* DC) is mainly due to hydroxycinnamic acid derivatives and vitamin C. For Kurilich et al. (2002), ascorbic acid and flavonoids did not explain the total variation in antioxidant capacity. These examples indicate that several types of molecules could be involved in the antioxidant activity of cabbage. The variations between these results could be caused by interactions with other molecules (Podszędek et al., 2006).

The contribution of GLSs to the overall cauliflower antioxidant capacity has never been determined, but Kusznierevicz et al. (2008) demonstrated a high correlation between antioxidant activities determined by ABTS<sup>+</sup> and DPPH<sup>•</sup> assays and the glucosinolate content of white cabbage. The GLS composition of white cabbage is close to the values reported here for cauliflower by-products, with about 30% glucobrassicin and 70% sinigrin (other main GLSs are glucoiberin, progoitrin, epiprogoitrin, and gluconapin). The authors showed a correlation of 0.81 between antioxidant activity and GLS content for the ABTS assay and 0.87 for the DPPH<sup>•</sup> assay. However, Nilsson et al. (2006) questioned whether GLSs actually contribute to antioxidant activity of cabbage. To test their hypothesis, we calculated the theoretical values of antioxidant activity of cauliflower extracts using the TE values determined from the pure compounds (Table 4). We used the four main glucosinolates present in cauliflower extracts, taking into account their levels in the extracts and the TE values obtained for each of them by ORAC. We found that, despite their antioxidant activity, these GLSs could account for only a small percentage of the total antioxidant activity (Table 4). According to the results of Plumb et al. (1996) for cabbage, our different assays demonstrated that the major antioxidant action of cauliflower by-products is far from being due only to glucosinolates, despite the antioxidant properties of some of them. The mere sum of the individual effects of GLSs may give only an estimation of the minimum threshold of their contribution to overall antioxidant capacity as it is likely that the antioxidant activity of cabbage results from the interaction of the different classes of molecules. In addition, the presence of glucosinolate breakdown derivatives in the cauliflower extracts, which has not yet been evaluated, could contribute greatly to the antioxidant activity of cauliflower extracts, as we have shown that EHDPs had much more potent antioxidant activities than the corresponding GLSs. However, even if the degradation of GLSs on the cut surface of the cabbage by-products after harvest may occur as the enzyme and substrate come into contact, the cauliflower dry material in this study was heated at 100 °C immediately after shredding, so we assumed that a high production of GLS derivatives did not occur.

The antioxidant capacity of foods is of great importance to human health. Many active phytochemicals are sources of antioxidants, such as vitamins and polyphenols and probably act in synergy. Determining the antioxidant activity of isolated glucosinolates present in cauliflower could be valuable for the food industry. The present results indicate that some glucosinolates play a role in the overall antioxidant capacity of cauliflower. The main indole GLS of cauliflower, glucobrassicin, was the most potent antioxidant as determined by both ORAC and SRSA assays, and glucoiberin and gluconapin were more active than ascorbic acid by ORAC. Therefore, these compounds probably act as proton

donors. No appreciable synergy or antagonism was found between glucosinolates *in vitro*, but this does not preclude that these kinds of interactions are possible *in vivo*, especially with other classes of compounds. Although GLSs represent only a part of the total antioxidant activity, the synergy of GLSs with various other molecules is probably important for the health benefits of cabbage. In addition, it is important to take into account that the *in vivo* antioxidant potential of GLSs is greatly increased by myrosinase-mediated breakdown to highly active derivatives. The literature in this field consistently suggests that total vegetable extracts, including by-products, are probably more relevant in the context for the food industry than purified molecules.

### Acknowledgements

This work was funded by the Region of Brittany in France (Project OXYGLU-2008) with the contribution of the Firm Agrival for cauliflower extracts (France). The authors thank Gwenael Pausé and the laboratory SCRIBE at INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, Rennes, France) for technical assistance.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.086.

### References

- Barillari, J., Canistro, D., Paolini, M., Ferroni, F., Pedulli, G. F., Iori, R., et al. (2005). Direct antioxidant activity of purified glucorucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. *Food Chemistry*, *53*, 2475–2482.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *28*, 25–30.
- Cartea, M. E., & Velasco, P. (2008). Glucosinolates in *Brassica* foods: Bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews*, *7*, 213–229.
- Fahey, J. W., & Talalay, P. (1999). Antioxidant functions of sulforaphane: A potent inducer of phase II detoxication enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, *37*, 973–979.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, *56*, 5–51.
- Ferreres, F., Sousa, C., Valentao, P., Seabra, R. M., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2007). Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) seeds: Phytochemical characterization and antioxidant potential. *Food Chemistry*, *101*, 549–558.
- Halkier, B. A., & Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 303–333.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M. G., Vincieri, F. F., & Romani, A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*, *99*, 464–469.
- Holst, B., & Williamson, G. (2004). A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compound. *Natural Products Reports*, *21*, 425–447.
- Khäkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., et al. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *47*, 3954–3962.
- Kiddle, G., Bennett, R. N., Botting, N. P., Davidson, N. E., Robertson, A. A. B., & Wallsgrove, R. M. (2001). High-performance liquid chromatographic separation of natural and synthetic desulphoglucosinolates and their chemical validation by UV, NMR, and chemical ionisation-MS methods. *Phytochemical Analysis*, *12*, 226–242.
- Kurilich, A. C., Jeffery, E. H., Juvik, J. A., Wallig, M. A., & Klein, B. P. (2002). Antioxidant capacity of different broccolis (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen absorbance capacity (ORAC) assay. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *50*, 5053–5057.
- Kushad, M. M., Brown, A. F., Kurilich, A. C., Juvik, J. A., Klein, B. P., Wallig, M. A., et al. (1999). Variation in glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *47*, 1541–1548.
- Kusznierevicz, B., Bartoszek, A., Wolska, L., Drzewiecki, J., Gorinstein, G., & Namiesnik, J. (2008). Partial characterization of white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities, and proteins. *LWT-Food Sciences and Technology*, *41*, 1–9.
- Llorach, R., Espin, J. C., Tomas-Barberán, F. A., & Ferreres, F. (2003). Valorization of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) by-products as a source of antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural Chemistry*, *51*, 2181–2187.



- Moiseeva, E. P., Almeida, G. M., Jones, G. D. D., & Manson, M. M. (2007). Extended treatment with physiologic concentrations of dietary phytochemicals results in altered gene expression, reduced growth, and apoptosis of cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 3071–3079.
- Nastruzzi, C., Cortesi, R., Esposito, E., Menegatti, E., Leoni, O., Iori, R., et al. (1996). In vitro cytotoxic activity of some glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44, 1014–1021.
- Nilsson, J., Olsson, K., Engqvist, G., Ekvall, J., Olsson, M., Nyman, M., et al. (2006). Variation in the content of glucosinolates, hydroxycinnamic acids, carotenoids, total antioxidant capacity, and low-molecular-weight carbohydrates in Brassica vegetables. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, 86, 528–538.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 4619–4626.
- Papi, A., Orlandi, M., Bartoloni, G., Barillari, J., Iori, R., Paolini, M., et al. (2008). Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (Kaiware Daikon) sprouts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56, 875–883.
- Piao, X. L., Kim, H. Y., Yokozawa, T., Lee, Y. A., Piao, X. S., & Cho, E. J. (2005). Protective effects of broccoli (*Brassica oleracea*) and its active components against radical-induced oxidative damage. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 5, 142–147.
- Plumb, G. W., Lambert, N., Chambers, S. J., Wanigatunga, S., Heaney, R. K., Plum, J. A., et al. (1996). Are whole extracts and purified glucosinolates from cruciferous vegetables antioxidants? *Free Radical Research*, 25, 75–86.
- Podszędek, A., Sosnowska, D., Redzyna, M., & Anders, B. (2006). Antioxidant capacity and content of *Brassica oleracea* dietary antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 49–58.
- Podszędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Sciences Technology*, 40, 1–11.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Süzen, S. (2007). Antioxidant activities of synthetic indole derivatives and possible activity mechanisms. In M. T. H. Khan (Ed.), *Topics in Heterocyclic Chemistry, Bioactive Heterocycles V* (Vol. 11, pp. 145–178). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Stratil, P., Klejdus, B., & Kuban, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables. Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 607–616.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Bastos, M. L. (2001). Antioxidant activity in *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 3476–3479.
- Vaughn, S., & Berhow, M. A. (2005). Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH Effects, isolation, and purification. *Industrial Crops and Products*, 21, 193–202.
- Valgimigli, L., & Iori, R. (2009). Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 222–237.
- Volden, J., Borge, G. I. A., Hansen, M., Wicklund, T., & Bengtsson, G. (2009). Processing (blanching, boiling, steaming) effects on the content of glucosinolates and antioxidant-related parameters in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. botrytis). *LWT – Food Science and Technology*, 42, 63–73.



#### **1.4. Conclusion**

Ce travail était le premier à utiliser les méthodes ORAC et SRSA pour mesurer l'activité antioxydante des GLSs. Elles se sont révélées les plus adaptées pour mesurer leur capacité antioxydante, ce qui pourrait être à mettre en relation avec un mode d'action des GLSs plutôt comme donneur d'hydrogène. En effet, la plupart des travaux précédents ont utilisé l'ABTS<sup>•+</sup>, et le DPPH<sup>•</sup> et ont, de ce fait, sans doute sous-estimé l'activité des GLSs. De plus, ces deux méthodes (ORAC et SRSA) sont considérées comme étant les plus représentatives des phénomènes biologiques.

La situation *in vivo* étant bien plus complexe, il convient de ne pas minimiser l'activité antioxydante des GLSs sur une étude *in vitro* mais de se pencher sur les effets des GLSs *in vivo*. C'est l'objet de la suite de ce travail qui a tenté d'évaluer le pouvoir protecteur des GLSs en observant la relation entre la réponse des plantes aux RI en fonction de la concentration en GLSs apportés dans le milieu de culture ou de la teneur endogène en GLSs des plantes. Les GLSs testés *in vitro*, ainsi que certains dérivés disponibles dans le commerce (AITC et I3C), seront ainsi testés au travers d'expériences d'apports exogènes de molécules (*cf* Chapitre 2 – 2.).

## **2. Effets d'un apport en glucosinolates lors de la réponse aux radiations ionisantes chez des espèces productrices ou non de glucosinolates**

Le pouvoir potentiellement antioxydant des GLSs a été testé *in vivo* par des apports exogènes de GLSs dans le milieu de culture. L'effet a été évalué en mesurant la modulation de la réponse des plantes face à une irradiation. Dans un premier temps, ces expériences ont été menées sur *A. thaliana*, puis dans un second temps sur des plantes non productrices de GLSs (*P. sativum* et *A. cepa*). En plus des GLSs dont le pouvoir antioxydant *in vitro* a été précédemment analysé, la glucotropaéoline (non étudiée *in vitro* car non présente dans le chou) et deux dérivés de GLSs disponibles sur le marché, l'AITC et l'I3C, ont été testés. La question majeure qui se pose dans ce type d'expérience est de cerner la dose efficace compte tenu des effets antioxydants et prooxydants connus (*cf* Introduction générale – 3.6.) et du fait que le pourcentage de GLSs à pénétrer dans la plante n'est pas connu. Aussi, afin de tester un grand nombre de combinaisons molécule / doses, l'évaluation de l'effet des apports exogènes a été réalisée sur des marqueurs simples qui ont montré leur efficacité dans le chapitre précédent (croissance racinaire, dosage de pigments) auxquels ont été ajoutées des mesures d'activités enzymatiques antioxydantes. Le Tableau 8 résume les différentes expériences (plantes, molécules, doses, marqueurs) menées dans cette section.

Les doses d'irradiation retenues ont été choisies de manière à avoir un effet significatif sur les témoins tout en permettant une croissance des plantes.

**Tableau 8 – Récapitulatifs des expériences d’apport exogènes (GLSs et molécules de références) menées sur les trois modèles végétaux (doses d’irradiation et concentrations en molécules ajoutées). Ir = irradiation.**

Espèce	<i>A. thaliana</i>	<i>P. sativum</i>	<i>A. cepa</i>
	irradiation Ir = 40 Gy	Ir = 15 Gy	Ir = 10 Gy
Ascorbate	0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM	0 ; 0,3 ; 10 ; 300 µM	0 ; 0,3 ; 10 ; 300 µM **
Glutathion	0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM	-	-
Tanacan	0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM	-	-
CuCl <sub>2</sub>	0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM	-	-
Sinigrine	0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 mM *	0 ; 0,3 ; 10 ; 300 µM	0 ; 0,01 ; 0,3 ; 10 ; 300 µM **
AITC	0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 mM *	-	-
Indole-3-carbinol	0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 mM *	0 ; 0,3 ; 10 ; 300 µM (+DMSO)	0 ; 0,3 ; 10 ; 300 µM (+DMSO) **
Glucoraphanine	0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM	-	-
Glucotropaéoline	0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM	0 ; 0,3 ; 10 ; 100 µM	0 ; 0,3 ; 10 ; 100 µM
Glucoibérine	0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM	-	-
Glucobrassicine	§	0 ; 0,3 ; 10 ; 100 µM	0 ; 0,3 ; 10 ; 100 µM
Gluconapine	-	§	0 ; 0,01 ; 0,3 ; 10 ; 100 µM
Progoïtrine	0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM	-	-
Marqueurs étudiés	MF et MS des parties aériennes Longueurs des racines primaires *Teneurs en chlorophylles et caroténoïdes	MF des parties aériennes et des racines	MF des parties aériennes et des racines ** activités GPX et GR

§ : données inexploitable pour cause de défaillance des conditions axéniques de la culture

### **2.1. Apports exogènes de glucosinolates et dérivés en fortes concentrations chez *A. thaliana***

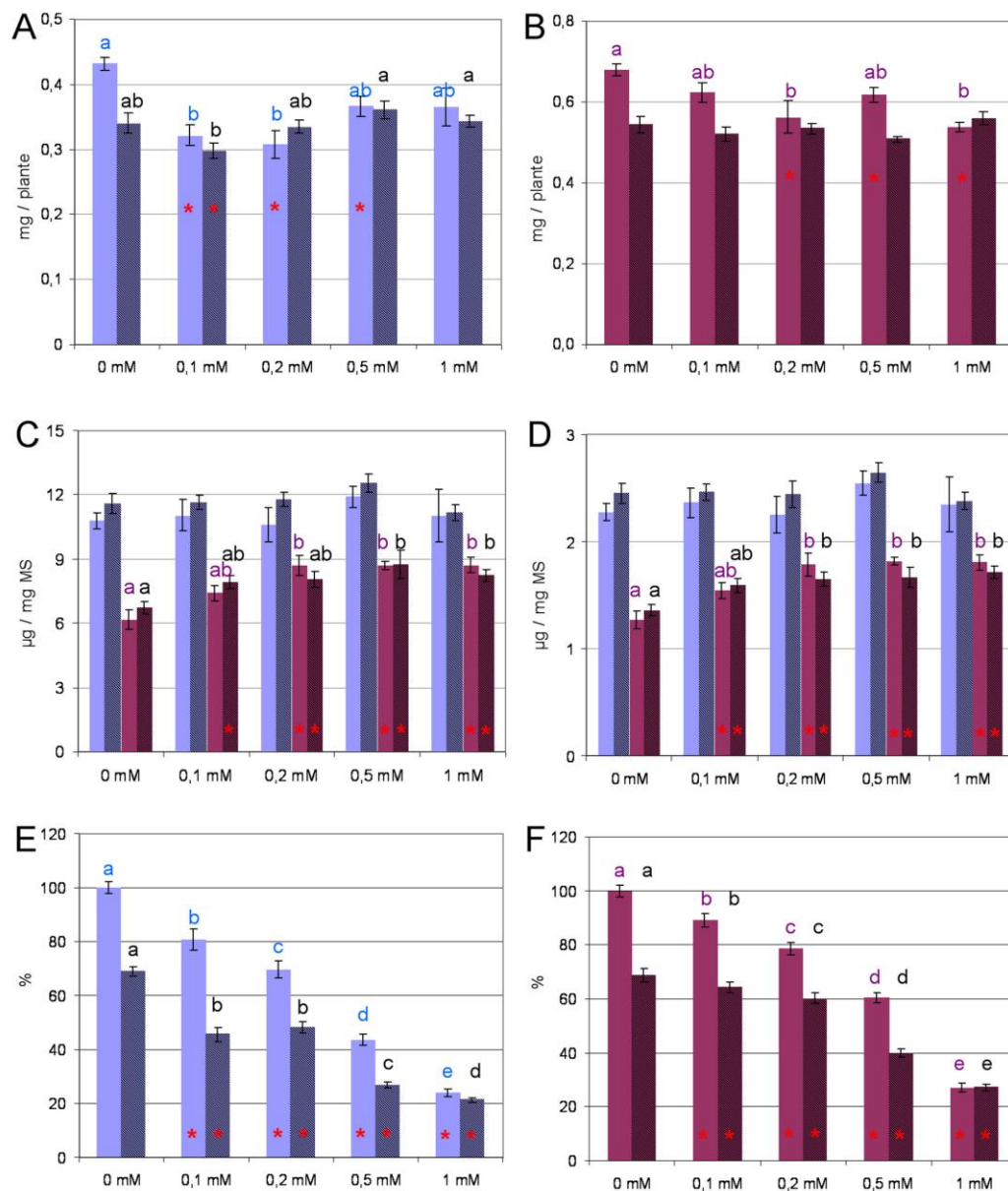
Les GLSs étant soupçonnés d’être antioxydants mais aussi pro-oxydants, deux gammes de concentrations, différentes d’un facteur 1000 ont été testées ; la première est de l’ordre du mM et la seconde du µM. La sinigrine ainsi que son dérivé l’AITC, et l’IBC (dérivé de la glucobrassicine), tous trois largement disponibles dans le commerce ont été utilisés pour tester les différences de réponse entre un apport en forte et faible concentration.

#### **2.1.1. Effets d’un apport en sinigrine**

La présence de sinigrine provoque une réduction de la matière sèche (MS) chez les plantes Col-0 non irradiées, pour les concentrations 0,1 et 0,2 mM et chez *Ler*, pour 1 mM. Après une irradiation à 40 Gy, la présence de sinigrine n’induit pas d’effet supplémentaire sur la MS par rapport aux plantes cultivées sans sinigrine (Figure 23 A et B).

Les teneurs en chlorophylles et caroténoïdes diminuent significativement à partir de 0,2 mM de sinigrine chez *Ler* uniquement avec ou sans irradiation (Figure 23 C et D). La croissance racinaire est le marqueur le plus affecté négativement par la sinigrine pour les deux

écotypes, avec ou sans irradiation et dès la concentration 0,1 mM. L'effet est dose dépendant (Figure 23 E et F).



**Figure 23 – Paramètres relatifs aux plantules d'*A. thaliana*, 10 jours après exposition à une dose de 40 Gy appliquée au stade 0.7, en fonction de la concentration en sinigrine apportée dans le milieu de culture. (● : Col-0\_0 Gy ; ● : Col-0\_40 Gy ; ● : Ler\_0 Gy ; ● : Ler\_40 Gy. (A) et (B) : matière sèche des parties aériennes ; (C) : teneurs en chlorophylles des parties aériennes ; (D) teneurs en caroténoïdes des parties aériennes ; (E) et (F) : longueurs racinaires mesurées en mm et exprimées en pourcentage par rapport au contrôle non irradié sur milieu non complété (0 Gy, 0 mM). Les lettres correspondent au classement des moyennes de Tukey après un test Anova significatif entre les concentrations en sinigrine pour une même condition d'irradiation (0 Gy ou 40 Gy). \* : significativement différent du témoin 0 mM (test t de Student) pour une même condition d'irradiation (aucun effet significatif de la sinigrine sur la MS des plantules Ler irradiées à 40 Gy ; aucun effet significatif de la sinigrine sur les teneurs en pigment des plantules Col-0 irradiées ou non).**

### 2.1.2. Comparaison de l'effet de la sinigrine et de deux dérivés, l'AITC et l'I3C

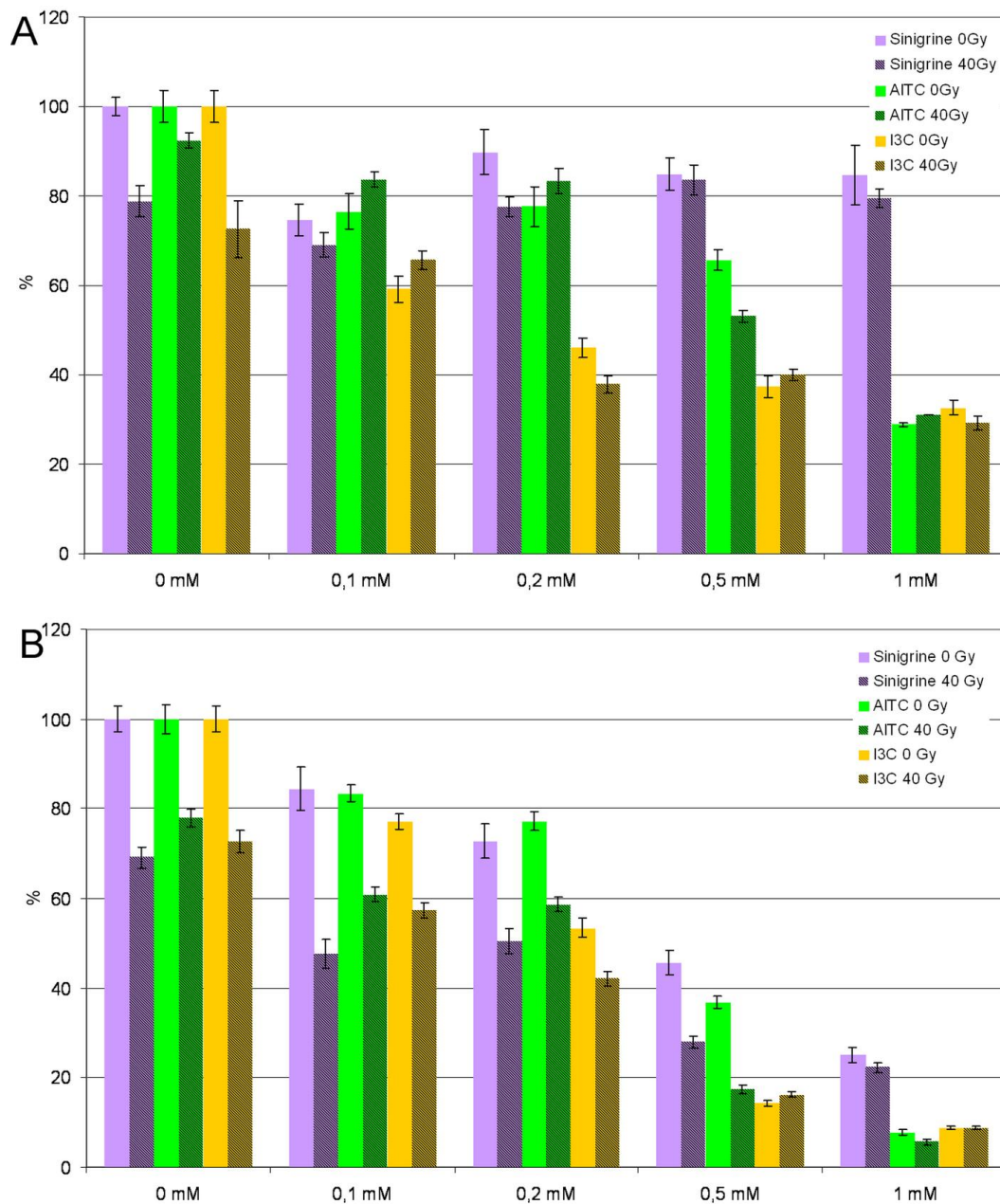
L'effet de la sinigrine a ensuite été comparé à celui de son dérivé, l'AITC et d'un autre dérivé : l'I3C, 3 molécules aisément disponibles dans le commerce. Un apport en AITC ou I3C dans le milieu provoque une diminution des MS de manière dose dépendante dès 0,1 mM (Figure 24 A). Cet effet négatif, indépendant de l'irradiation, est plus flagrant pour l'I3C, molécule pour laquelle on observe une diminution de 50% de MS à 0,2 mM (-20% seulement pour l'AITC à cette même concentration). L'effet est plus important que celui de la sinigrine. Par ailleurs, il n'y a pas de différence entre les plantes irradiées (40 Gy) et non irradiées.

Les croissances racinaires sont affectées par l'ajout des 3 molécules dans le milieu, de manière dose dépendante. A 0,1 et 0,2 mM, les trois molécules aggravent significativement l'effet des radiations. A 0,5 et 1 mM, l'aggravation de l'effet radiation par l'AITC et l'I3C n'est plus significative mais l'inhibition par les molécules elles-mêmes est supérieure à 80% (effet similaire à la sinigrine à 1 mM ; Figure 24 B).

Les teneurs en pigments (chlorophylles et caroténoïdes) sont réduites à partir d'une concentration de 0,2 mM en présence des dérivés AITC et l'I3C, mais pas de la sinigrine (Figure 25).

Les mêmes expériences ont été menées sur l'écotype *Ler*. Les résultats montrent un comportement globalement similaire à celui de Col-0 par rapport aux apports d'AITC et d'I3C (Figure 45 et Tableau 17 dans l'Annexe 3). On note cependant une différence de sensibilité par rapport à l'I3C dont la concentration 0,2 mM affecte beaucoup moins la MS de *ler* (-30% contre -54% pour Col-0). L'effet stimulateur de la sinigrine sur les teneurs en pigments de *Ler* n'est pas observé avec l'AITC et l'I3C qui ont au contraire un effet négatif sur ce critère.

De manière générale, les trois molécules testées aggravent l'effet des radiations de façon dose-dépendante aux concentrations appliquées avec un effet accru pour l'I3C.



**Figure 24 – Masse sèche par plante (A) et longueurs des racines primaires (B), dix jours après irradiation à la dose 40 Gy, en fonction de l'apport en Sinigrine, AITC et I3C chez *A. thaliana* écotype Col-0. Les masses sont mesurées en mg / plante et les longueurs racinaires en mm, pour être ensuite exprimées en pourcentage par rapport au contrôle non irradié sur milieu non complété (0 Gy, 0 mM). Les statistiques relatives à ces graphiques sont présentées dans le Tableau 9.**



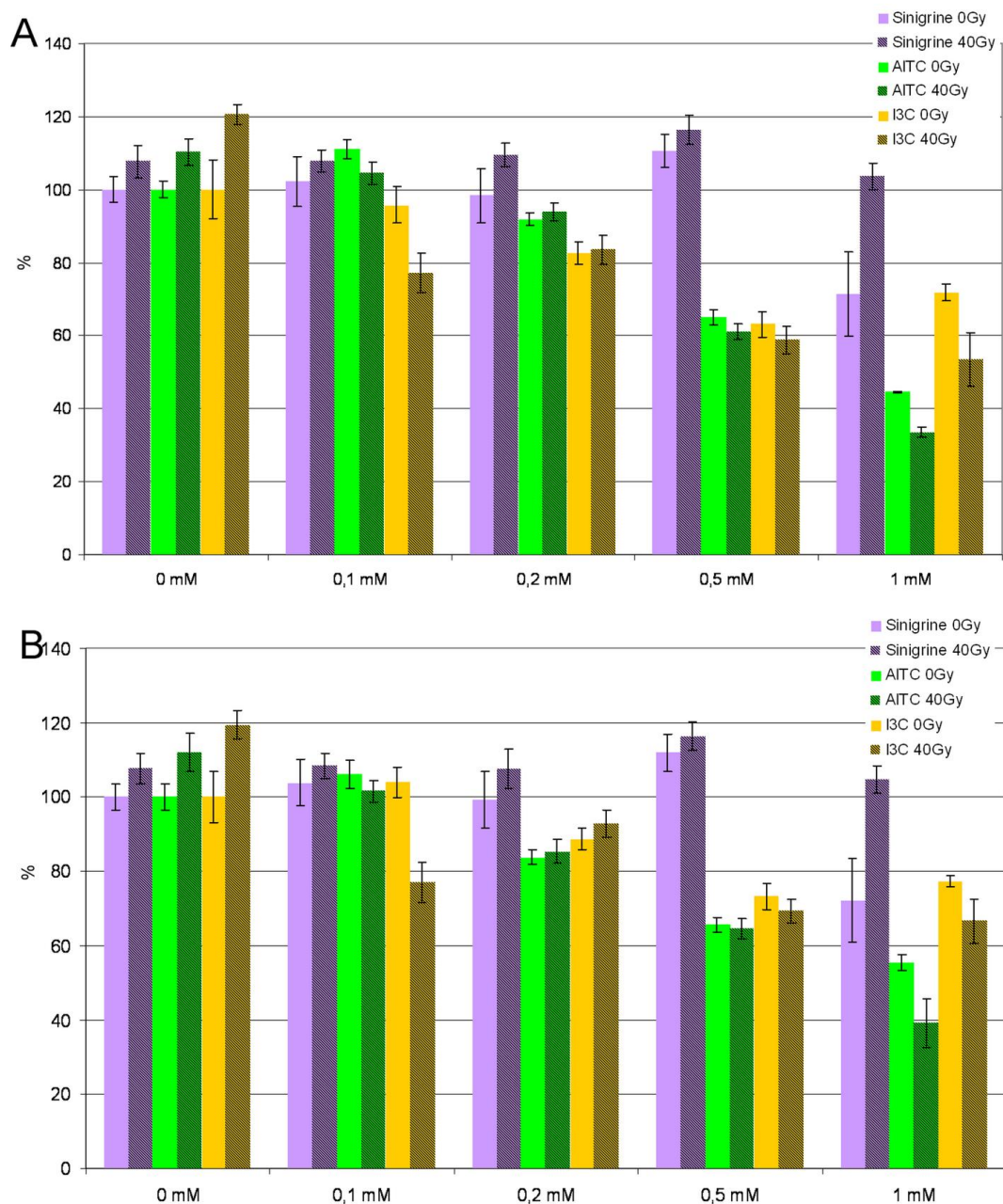


Figure 25 – Teneurs en chlorophylles (A) et caroténoïdes (B), dix jours après irradiation à la dose 40 Gy, en fonction de l'apport en Sinigrine, AITC et I3C chez *A. thaliana* écotype Col-0. Les teneurs sont mesurées en  $\mu\text{g} / \text{mg}$  de MS puis exprimées en pourcentage par rapport au contrôle non irradié sur milieu non complété (0 Gy, 0 mM). Les statistiques relatives à ces graphiques sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9 – Statistiques relatives aux marqueurs étudiés chez *A. thaliana*, écotype Col-0 lors des expériences d'apports exogènes en sinigrine, AITC et I3C (Figures 24 et 25). Les lettres correspondent au classement des moyennes de Tukey après un test Anova significatif entre les concentrations en sinigrine pour une même condition d'irradiation (0 Gy ou 40 Gy). \* : significativement différent du témoin 0 mM pour une même condition d'irradiation (cf M&M – 11.); ns : aucun effet significatif ; irr : irradiation.

	Molécule	Irr (Gy)	0 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM
MS	Sinigrine	0	a	b *	b *	ab *	ab
		40	ab	b	ab	a	a
	AITC	0	a	b *	b *	b *	c *
		40	a	b *	b *	c *	d *
	I3C	0	a	b *	c *	cd *	d *
		40	a	a	b *	b *	b *
Racines	Sinigrine	0	a	b *	c *	d *	e *
		40	a	b *	b *	c *	d *
	AITC	0	a	b *	c *	d *	e *
		40	a	b *	b *	c *	d *
	I3C	0	a	b *	c *	d *	e *
		40	a	b *	c *	d *	e *
Chlorophylles	Sinigrine	0	ns	ns	ns	ns	ns
		40	ns	ns	ns	ns	ns
	AITC	0	b	a *	b *	c *	d *
		40	a	ab	b *	c *	d *
	I3C	0	a	a	ab	b *	b *
		40	a	b *	b *	c *	c *
Caroténoïdes	Sinigrine	0	ns	ns	ns	ns	ns
		40	ns	ns	ns	ns	ns
	AITC	0	a	a	b *	c *	c *
		40	a	ab	b *	c *	c *
	I3C	0	a	a	ab	b *	b *
		40	a	bc *	b *	c *	c *

Les résultats des expériences précédentes utilisant des apports exogènes en sinigrine, AITC et I3C ont montré un effet inhibiteur de ces molécules aux concentrations testées. Aussi, la recherche d'effets modulateurs des GLSs et de leurs dérivés dans la réponse aux radiations par cette méthode s'est orientée par la suite vers des concentrations plus faibles (inférieures à 10 µM). De plus, d'autres GLSs, dont le pouvoir antioxydant a été mis en évidence *in vitro* ont été testés ainsi que des molécules de référence aux propriétés antioxydantes connues comme l'ascorbate ou le glutathion. Seul, l'écotype Col-0 a été utilisé par la suite.

## 2.2. Apports exogènes de glucosinolates en faibles concentrations chez *A. thaliana*

Le même type d'expérience que précédemment a été réitéré en apportant les GLSs en concentrations plus faibles, c'est à dire de 0,01 à 10 µM. Parmi eux, la sinigrine, la glucoraphanine, la glucoibérine et la progoïtrine dont l'activité antioxydante « *in vitro* » a été

mesurée. En parallèle, des composés décrits comme antioxydant (ascorbate et tanacan, un extrait de *Ginko biloba*) ou pro-oxydant ( $\text{CuCl}_2$ ) ont également été testés selon le même protocole afin de relativiser les effets obtenus avec les GLSs. Les résultats obtenus pour la croissance racinaire, marqueur le plus sensible de la réponse des plantes, sont présentés à suivre.

### 2.2.1. Effet des molécules ajoutées au milieu de culture

L'effet sur la croissance racinaire suivie journalièrement, est présenté à trois temps dans ce document : au 4<sup>ème</sup> jour de culture (temps utilisé pour l'irradiation), au 14<sup>ème</sup> jour de culture (fin de l'expérience) et au temps intermédiaire du 11<sup>ème</sup> jour de culture ou certains effets transitoires sont visibles. Les figures 26 et 27 présentent les résultats détaillés respectivement au 4<sup>ème</sup> jour et à la fin de l'expérience. Ceux du 11<sup>ème</sup> jour de culture ont été mis en Annexe 4. Le Tableau 10 synthétise l'ensemble.

L'ajout d'antioxydants dans le milieu agit différemment en fonction de la molécule apportée. L'acorbate et le tanacan ont des effets négatifs dès le 4<sup>ème</sup> jour de culture et jusqu'à la fin de l'expérience, à des concentrations différentes (10  $\mu\text{M}$  pour l'ascorbate et 0,01  $\mu\text{M}$  pour le tanacan). Une concentration de glutathion de 0,01  $\mu\text{M}$  a par contre un effet stimulant précoce de la croissance racinaire qui a disparait à 14 jours. Le chlorure de cuivre, un oxydant, n'a aucun effet sur la croissance racinaire aux concentrations apportées.

En ce qui concerne les GLSs, seule la glucoraphanine a un effet stimulant sur la croissance racinaire, et ce pendant toute l'expérience et pour toutes les doses appliquées. La glucotropaéoline et la progoïtrine inhibent la croissance racinaire. C'est aussi le cas de la sinigrine à 10  $\mu\text{M}$ , malgré une stimulation précoce par la concentration 0,01  $\mu\text{M}$ . Enfin, la glucoibérine n'a aucun effet sur la croissance racinaire.

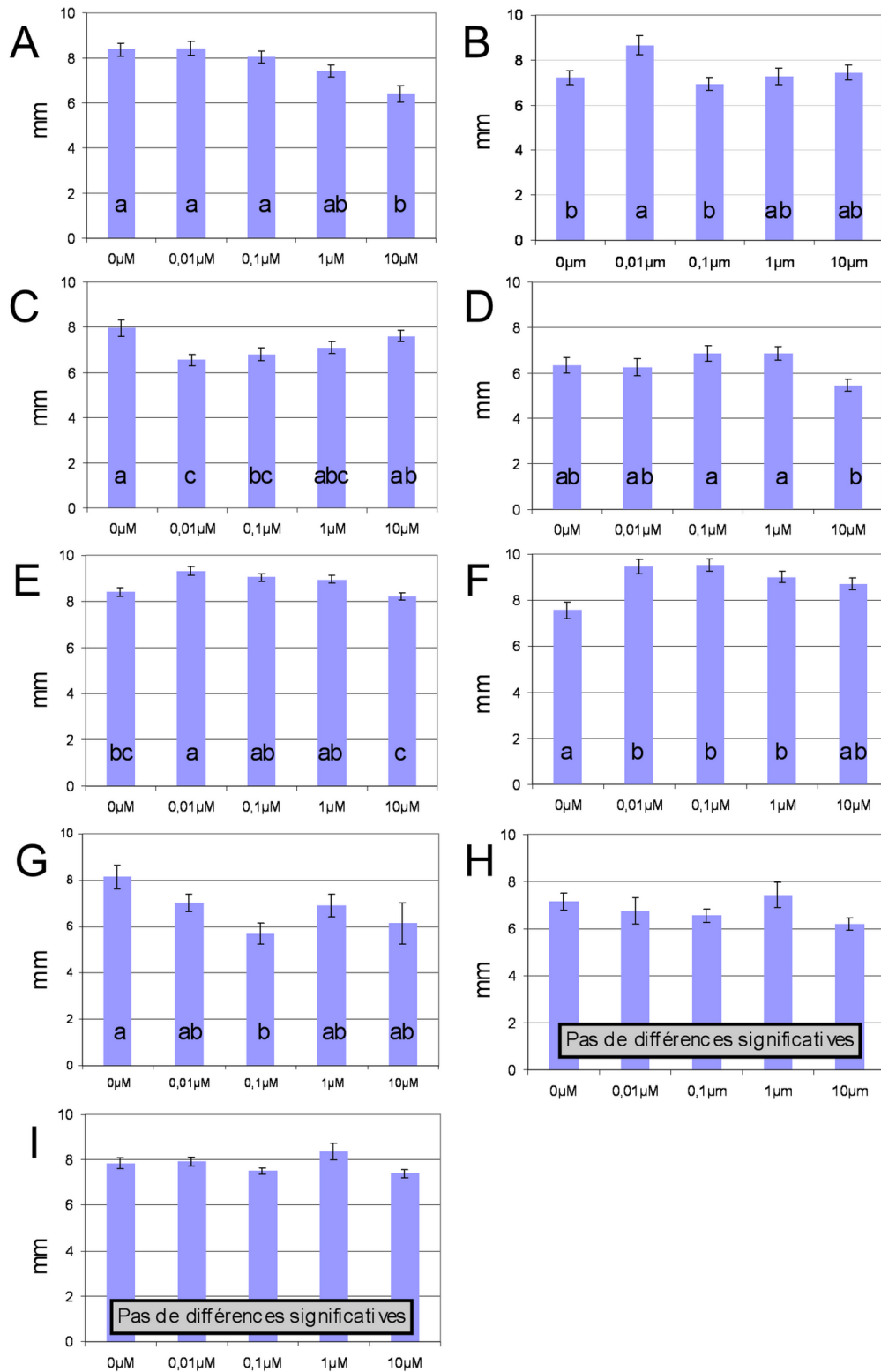


Figure 26 – Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* après 4 jours de culture (stade d'irradiation) en fonction de la concentration du milieu en différentes molécules : (A) ascorbate ; (B) glutathion ; (C) tanacetin ; (D) : CuCl<sub>2</sub> ; (E) sinigrine ; (F) glucoraphanine ; (G) glucotropaeoline ; (H) glucoibérine ; (I) progoïtrine. Les lettres correspondent au classement des moyennes de Tukey après un test Anova significatif entre les concentrations en molécules (cf M&M – 11.). Aucun effet significatif de la glucoibérine et de la progoïtrine.

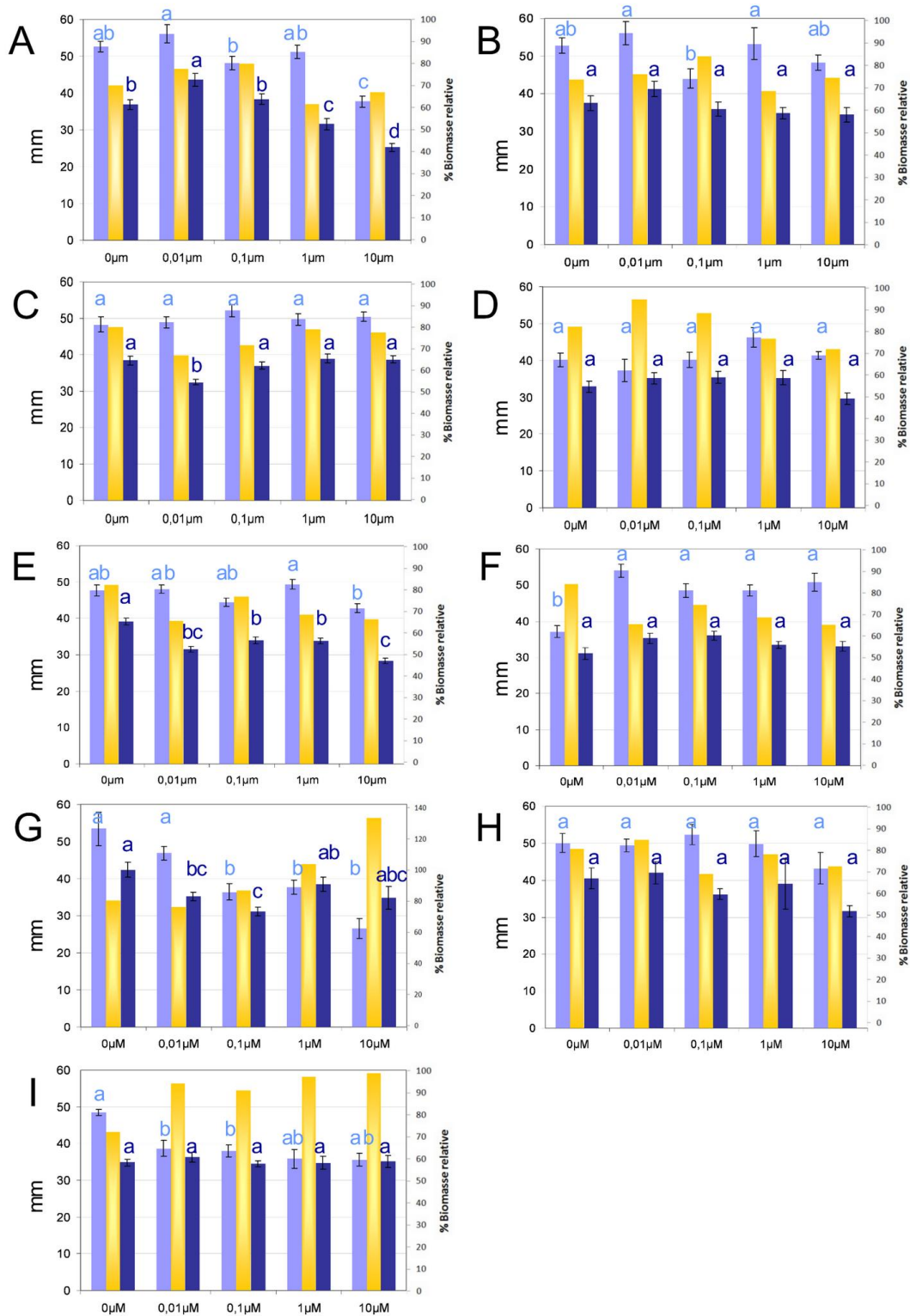


Figure 27 – Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* au 14<sup>ème</sup> jour de culture en fonction de l'irradiation (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) et de la concentration du milieu en différentes molécules : (A) ascorbate ; (B) glutathion ; (C) tanacan ; (D) : CuCl<sub>2</sub> ; (E) sinigrine ; (F) glucoraphanine ; (G) glucotropaéoline ; (H) glucoibérine ; (I) progoitrine. Les lettres correspondent au classement des moyennes de Tukey après un test Anova significatif entre les concentrations en molécules (cf M&M – 11.).

**Tableau 10 – Effets des GLSs et des molécules antioxydantes et pro-oxydantes sur la croissance racinaire d’*A. thaliana* en l’absence d’irradiation. Les concentrations indiquées sont celles pour lesquelles l’effet est significatif. ns = pas d’effet significatif.**

	4 <sup>ème</sup> jour de culture	11 <sup>ème</sup> jour de culture	14 <sup>ème</sup> jour de culture
Ascorbate	10 µM ↓	10 µM ↓	10 µM ↓
Glutathion	0,01 µM ↑	Non déterminé	ns
Tanacan	0,01 et 0,1 µM ↓	0,01 µM ↓	0,01 µM ↓
CuCl <sub>2</sub>	Pas d’effet	Pas d’effet	Pas d’effet
Sinigrine	0,01 µM ↑	10 µM ↓	10 µM ↓
Glucoraphanine	0,01, 0,1 et 1 µM ↑	0,01, 0,1, 1 et 10 µM ↑	0,01, 0,1, 1 et 10 µM ↑
Glucotropaéoline	0,1 µM ↓	0,1, 1 et 10 µM ↓	0,1, 1 et 10 µM ↓
Glucoibérine	ns	ns	ns
Progoïtrine	Pas d’effet	0,1 µM ↓	0,01 et 0,1 µM ↓

### 2.2.2. Effet des molécules après irradiation

Le cumul des deux facteurs, ajout d’un antioxydant (ou oxydant pour le cuivre) et irradiation a été testé par une anova à deux facteurs. Une p-value inférieure à 0,05 indique une interaction significative entre la molécule et l’irradiation (Figure 27 et Tableau 18 en Annexe 5 pour les statistiques), ce qui veut dire que les effets de la molécule et de l’irradiation ne sont pas simplement cumulatifs. Ainsi, on observe que :

- L’effet RI / ascorbate 10 µM est inférieur aux effets négatifs observés pour les deux facteurs séparément (ex : au 14<sup>ème</sup> jour de culture : effet RI = -30% ; effet ascorbate 10 µM = -28% ; effet RI / ascorbate 10 µM = -52%).
- L’effet RI / sinigrine à 10 µM est supérieur à la somme des effets négatifs observés pour les deux facteurs séparément (ex : au 11<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour de culture : effet RI = -20% ; effet sinigrine 10 µM = -10% ; effet RI / sinigrine 10 µM = -40%).
- L’effet positif de la glucoraphanine tout au long de l’expérience atténue l’effet négatif des radiations (ex : au 14<sup>ème</sup> jour de culture : effet RI = -16% ; effet glucoraphanine 0,1 µM = +31% ; effet RI / glucoraphanine 0,1 µM = -3%).
- L’effet RI / glucotropaéoline est inférieur aux effets négatifs observés pour les deux facteurs séparément (ex : au 14<sup>ème</sup> jour de culture, effet RI = -20% ; effet glucotropaéoline 10 µM = -50% ; effet RI / glucotropaéoline 10 µM = -35%).

- La glucoibérine, qui n'avait pas d'effet significatif seule, aggrave légèrement l'effet de l'irradiation au 14<sup>ème</sup> jour de culture (effet RI = -19% ; effet glucoibérine 10 µM = -13% (non significative) ; effet RI / glucoibérine 10 µM = -37%).
- L'effet RI / progoïtrine est égal à l'effet de l'irradiation seule (au 14<sup>ème</sup> jour de culture : effet RI = -28% ; effet progoïtrine 0,1 µM = -21% ; effet RI / progoïtrine 0,1 µM = -29%).

### **2.3. Effets des faibles doses en différents glucosinolates et dérivés chez des plantes non productrices de glucosinolates**

Après avoir analysé la réponse d'une plante productrice de glucosinolates, *A. thaliana*, face à un apport de GLSs dans le milieu de culture, il était pertinent de tester un modèle végétal non producteur de glucosinolates. Les réponses des plantes aux radiations ionisantes pouvant varier d'une espèce à l'autre, voire en fonction des variétés, deux espèces, *Pisum sativum* (cv *Baccara*) et *Allium cepa*, ont été retenus. Dans un premier temps, la même démarche que pour *A. thaliana* a été entreprise afin de déterminer leur radiosensibilité pour se situer dans une dosimétrie provoquant un effet visible mais non létal. Dans un second temps, l'effet de l'apport de GLSs dans le support de culture a été analysé.

#### *2.3.1. Effets des radiations ionisantes sur le développement de *P. sativum* et *A. cepa**

Pour étudier le comportement de *P. sativum* après irradiation, la variété de pois protéagineux « Baccara » a été retenue comme modèle pour sa meilleure adaptation au système de culture et à la stérilisation. Les plantules de *P. sativum* sont irradiées à 4 jours de culture à 10 Gy, 15 Gy ou 40 Gy. L'effet est évalué à 8 jours de culture soit 4 jours après irradiation.

La masse fraîche des parties aériennes est affectée à partir de la dose 15 Gy (-24%) et la celle de la racine primaire diminue de manière dose dépendante (significatif à partir de 15 Gy) (Figure 28). Cette diminution est due à une réduction de la longueur racinaire ainsi qu'à une diminution du nombre de racines secondaires dont la croissance est fortement inhibée à partir de la dose 10 Gy (Figure 29).

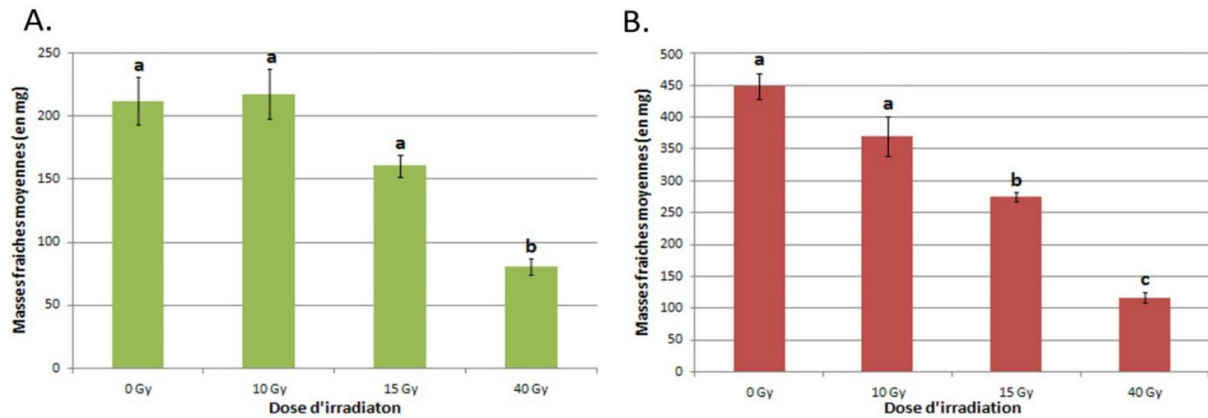


Figure 28 – Masses fraîches des parties aériennes (●) et des racines (●) des plantules de *Pisum sativum* cv *Baccara* âgées de 8 jours selon la dose d'irradiation. Le traitement est réalisé au 4<sup>ème</sup> jour de culture.

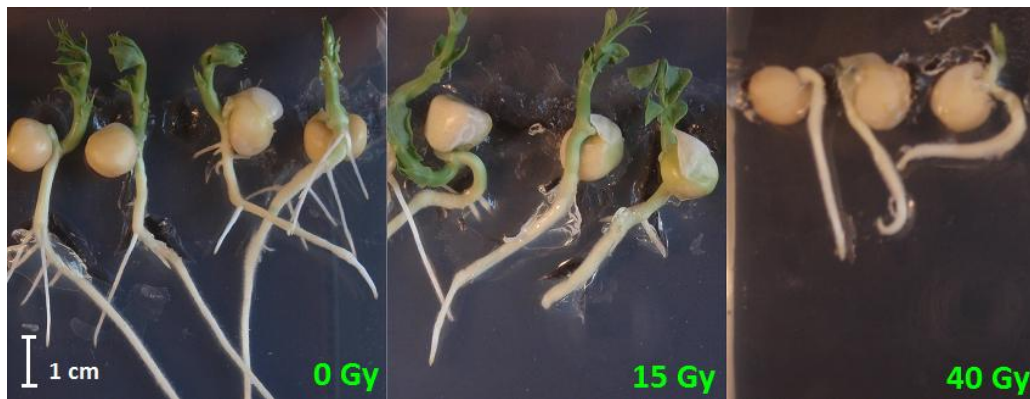


Figure 29 – Photographies de pois (*Pisum sativum* cv *Baccara*) âgés de 8 jours et irradiés à des doses de à 0, 15 et 40 Gy au quatrième jour de culture.

Les plantules d'*A. cepa* sont irradiées à 10 Gy, 20 Gy et 40 Gy après 8 jours de culture et les effets évalués à 17 jours soit après 9 jours d'irradiation. Ces doses n'ont pas d'effet sur les masses fraîches des parties aériennes (Figure 30). On a cependant constaté que les plantes irradiées ont tendance à former plus fréquemment des bulbes et que l'apparition de la première feuille est retardée (Figure 31).

Par ailleurs, l'irradiation freine fortement la croissance racinaire d'*A. cepa* dès la dose 10 Gy (-78% ; Figure 30). Morphologiquement, cette diminution se traduit par l'apparition d'une unique racine souvent très courte (1 à 2 mm) tandis que les plantes contrôles forment un complexe racinaire de 5 à 6 racines (racines adventives, système racinaire fasciculé) d'une longueur pouvant atteindre 1 à 2 cm (Figure 31).



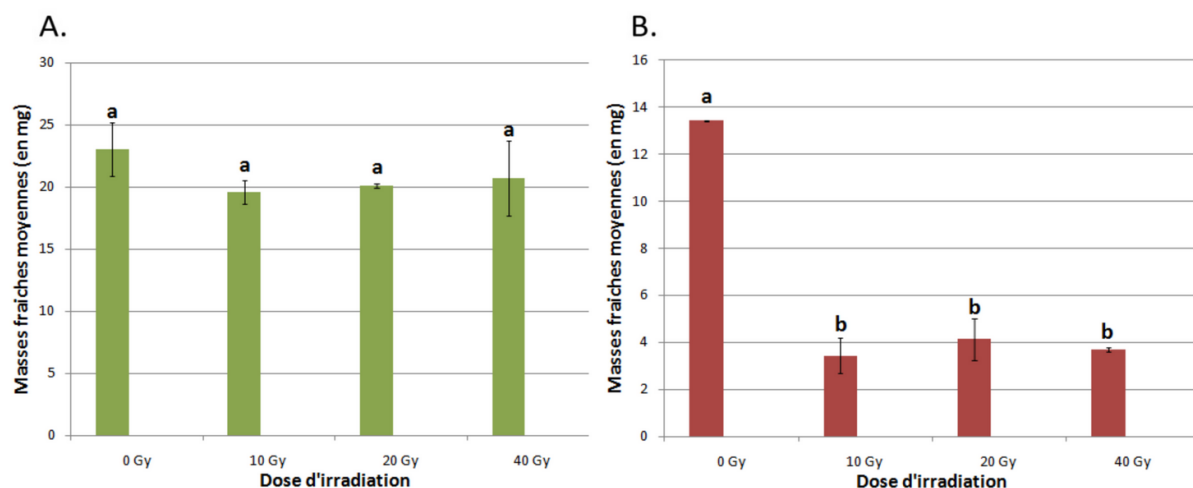


Figure 30 – Masses fraîches des parties aériennes (●) et des racines (●) d'*Allium cepa* âgées de 17 jours selon la dose d'irradiation. Le traitement est réalisé au 8<sup>ème</sup> jour de culture.



Figure 31 – Photographies comparatives des bulbes et racines d'*Allium cepa* âgés de 19 jours et irradiés à des doses de 0 et 10 Gy au huitième jour de culture.

### 2.3.2. Effets des glucosinolates sur le développement des plantes de *P. sativum* et d'*A. cepa* soumises aux radiations ionisantes

L'effet des GLSs, des dérivés et de l'ascorbate, seuls ou associés à l'irradiation, a été analysé après culture pour des concentrations en molécules allant de 0 à 300  $\mu$ M. La représentation détaillée des résultats est illustrée en Annexe 6 (Figures 47 à 52). Le Tableau 11 présente de manière plus synthétique l'ensemble des résultats. Afin de reproduire des conditions analogues à celles appliquées sur le modèle *A. thaliana*, les germinations d'*A. cepa* ont été irradiées à une dose de 10 Gy et celles de *P. sativum* à une dose de 15 Gy, ces deux doses ayant un effet sur la racine mais pas sur les masses fraîches des parties aériennes.

**Tableau 11 – Récapitulatif des effets observés sur le développement de *P. sativum* et *A. cepa* lors des expériences d’apport exogènes en fonction de l’irradiation et des concentrations apportées en molécules. NI = non irradié ; Ir = irradiation (15 Gy sur *P. sativum* et 10 Gy sur *A. cepa*) ; ns = pas d’effet significatif ; PA = masse fraîche des parties aériennes ; R = masse fraîche des racines ; rpR = possible radioprotection au niveau des racines (pourcentage de biomasse relative Ir/CT croissant avec la concentration en molécule) ; rpPA = possible radioprotection au niveau des parties aériennes.**

Concentration		<i>P. sativum</i>					<i>A. cepa</i>					
		( $\mu$ m)	0	0,3	10	100	300	0	0,01	0,3	10	100
Ascorbate	NI	ns	ns	ns	-	ns	ns	-	ns	ns	-	ns
	Ir	ns	ns	ns	-	PA↓ R↓	ns	-	ns	RpR	-	RpR
Sinigrine	NI	ns	PA↑	ns	-	PA↓ R↓	ns	ns	ns	ns	-	ns
	Ir	ns	ns	RpR RpA	-	RpR RpA	ns	ns	ns	ns	-	ns
Glucobrassicine	NI	ns	ns	R↓	PA↓ R↓	-	ns	-	ns	ns	ns	-
	Ir	ns	RpA	RpA	RpA	-	ns	-	ns	ns	ns	-
Indole-3-carbinol	NI	ns	ns	ns	-	ns	ns	-	ns	ns	-	ns
	Ir	ns	ns	ns	-	RpA	ns	-	ns	ns	-	ns
Glucotropaéoline	NI	ns	ns	ns	ns	-	ns	-	R↓	ns	ns	-
	Ir	ns	ns	ns	ns	-	ns	-		ns	ns	-
Gluconapine	NI	§	§	§	§	§	ns	ns	ns	ns	R↑	-
	Ir	§	§	§	§	§	ns	ns	ns	ns	ns	-

§ : données sur *P. sativum* inexploitable pour cause de défaillance des conditions axéniques de la culture

L'ajout d'**ascorbate** dans le milieu n'a aucun effet sur les masses fraîches des plantes non irradiées de *P. sativum* et d'*A. cepa* (Annexe 6 – Figure 47). Par contre, après irradiation, l'ascorbate à 300  $\mu$ M accentue l'action inhibitrice des radiations sur la croissance des parties aériennes et des racines chez le pois. Cet effet n'a pas été observé sur les masses fraîches de l'oignon. De plus, l'ascorbate semble avoir un effet plutôt positif sur les racines chez l'oignon bien que cette tendance ne soit pas statistiquement significative. En effet, on observe une diminution du pourcentage d'inhibition après irradiation pour des doses croissantes d'ascorbate.

La forte concentration de **sinigrine** 300  $\mu$ M inhibe le développement des parties aériennes et des racines du pois, suggérant une certaine toxicité de la molécule à cette dose (Annexe 6 – Figure 48). Au contraire, une faible concentration de 0,3  $\mu$ M stimule significativement la croissance des parties aériennes. On note également une augmentation du pourcentage de biomasse relative (Ir/CT) sur les parties aériennes et les racines pour les doses 10 et 300  $\mu$ M, ce qui pourrait indiquer un effet protecteur de la sinigrine face à l'irradiation. Chez l'oignon,

l'apport en sinigrine n'a pas d'effet sur les biomasses aériennes et racinaires, ni sur les plantes contrôles, ni sur les plantes irradiées.

La **glucobrassicine** inhibe la biomasse des parties aériennes et les racines de manière dose dépendante (Annexe 6 – Figure 49). Le pourcentage de biomasse relative Ir/CT est croissant pour les parties aériennes ce qui pourrait traduire un possible effet protecteur face à l'irradiation alors qu'il est constant pour les racines. La glucobrassicine n'a eu aucun effet chez l'oignon.

L'**indole-3-carbinol** (I3C), dérivé de la glucobrassicine, peu soluble dans l'eau a été dilué dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, concentration finale de 1%). Le DMSO étant connu comme antioxydant (il réagit notamment spécifiquement avec les radicaux hydroxyles pour donner des produits stables ; Tai *et al.* 2002), son effet a été vérifié. Apporté seul à la concentration de 1%, il n'a aucun effet sur la croissance du pois. Par contre, il provoque une diminution de la croissance racinaire de l'oignon (Annexe 6 – Figure 50).

Chez le pois, l'I3C n'a pas d'effet significatif sur la croissance des parties aériennes et racinaires. La dose 300  $\mu\text{M}$  a par ailleurs un effet positif sur la biomasse relative Ir/CT des parties aériennes (105%) ce qui suggère une radioprotection importante. Chez l'oignon, l'I3C n'a produit aucun effet. Par ailleurs, l'irradiation annule l'effet négatif du DMSO sur la croissance racinaire.

Chez le pois, la **glucotropaeoline** n'a aucun effet (Annexe 6 – Figure 51). Chez *A. cepa*, la glucotropaeoline n'affecte pas le développement des parties aériennes sauf pour la concentration 0,3  $\mu\text{M}$  qui réduit la masse des racines de près de 4 mg par plante. Après irradiation, aucun effet n'est visible.

L'effet de la **gluconapine** a été analysé uniquement sur le modèle *A. cepa* (données sur *P. sativum* inexploitable). L'apport de gluconapine n'affecte pas la croissance des parties aériennes, irradiées ou non. Par contre la dose 100  $\mu\text{M}$  procure une stimulation de la croissance racinaire qui cependant ne se traduit pas par une amélioration de la protection face aux radiations (Annexe 6 – Figure 52).

### 2.3.3. Modulation par les glucosinolates des activités enzymatiques antioxydantes en réponse aux radiations ionisantes

En complément des données précédentes, l'effet des apports en ascorbate, sinigrine et I3C et des radiations ionisantes a été analysé sur l'activité des enzymes impliquées dans le stress oxydant, la guaiacol peroxydase (GPX) et de la glutathion réductase (GR) pour le modèle *A. cepa* (cf Introduction générale – 2.3.3.).

#### 2.3.3.1. Activités GPX et GR en fonction de l'irradiation sur *A. Cepa*

L'activité GPX augmente au niveau des parties aériennes après l'irradiation à 10 Gy mais pas dans les racines (Figure 32). Il est intéressant de noter que cet effet stimulant obtenu pour 10 Gy a été reproduit dans les 3 expérimentations suivantes. Les doses 20 Gy et 40 Gy provoquent au contraire une réduction de cette activité dans les parties aériennes et racinaires (jusqu'à -75% dans les racines). Par ailleurs, l'activité GR est stimulée pour la dose 40 Gy au niveau des parties aériennes alors que dans les racines, elle est inhibée de manière dose-dépendante.

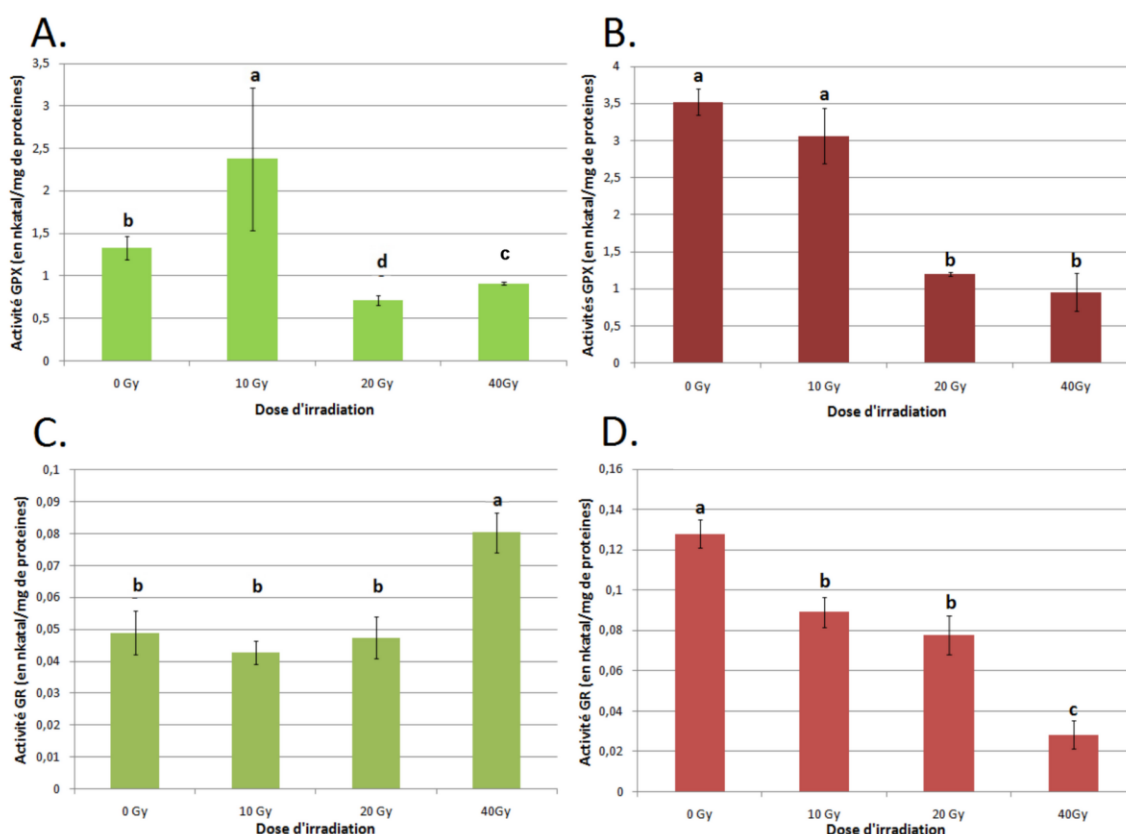


Figure 32 – Activités de la guaiacol peroxydase (A et B) et de la glutathion réductase (C et D) dans les parties aériennes (●) et dans les racines (●) de plantules d'*Allium cepa* âgées de 17 jours soumises à différentes doses d'irradiation. Le traitement est réalisé au 8<sup>ème</sup> jour de culture.

### 2.3.3.2. Activités GPX et GR après un apport exogène en Ascorbate

En l'absence d'irradiation, l'ascorbate stimule l'activité GPX dès la concentration 0,3  $\mu\text{M}$  dans les parties aériennes des plantes. Au niveau des racines, la même tendance est observée à partir de 10  $\mu\text{M}$  sans qu'elle soit significative. Après irradiation à la dose 10 Gy, l'activité GPX augmente dans les parties aériennes en présence de 0,3  $\mu\text{M}$  d'ascorbate, et à nouveau de manière non significative au niveau des racines (Figure 33 A,B).

L'apport en ascorbate n'a pas d'effet sur l'activité GR des parties aériennes des plantes irradiées ou non. Par contre, au niveau des racines, les concentrations de 0,3 et 10  $\mu\text{M}$  stimulent l'activité GR des plantes non irradiées. Cette induction de la GR racinaire est absente chez les plantes irradiées (Figure 33 C,D).

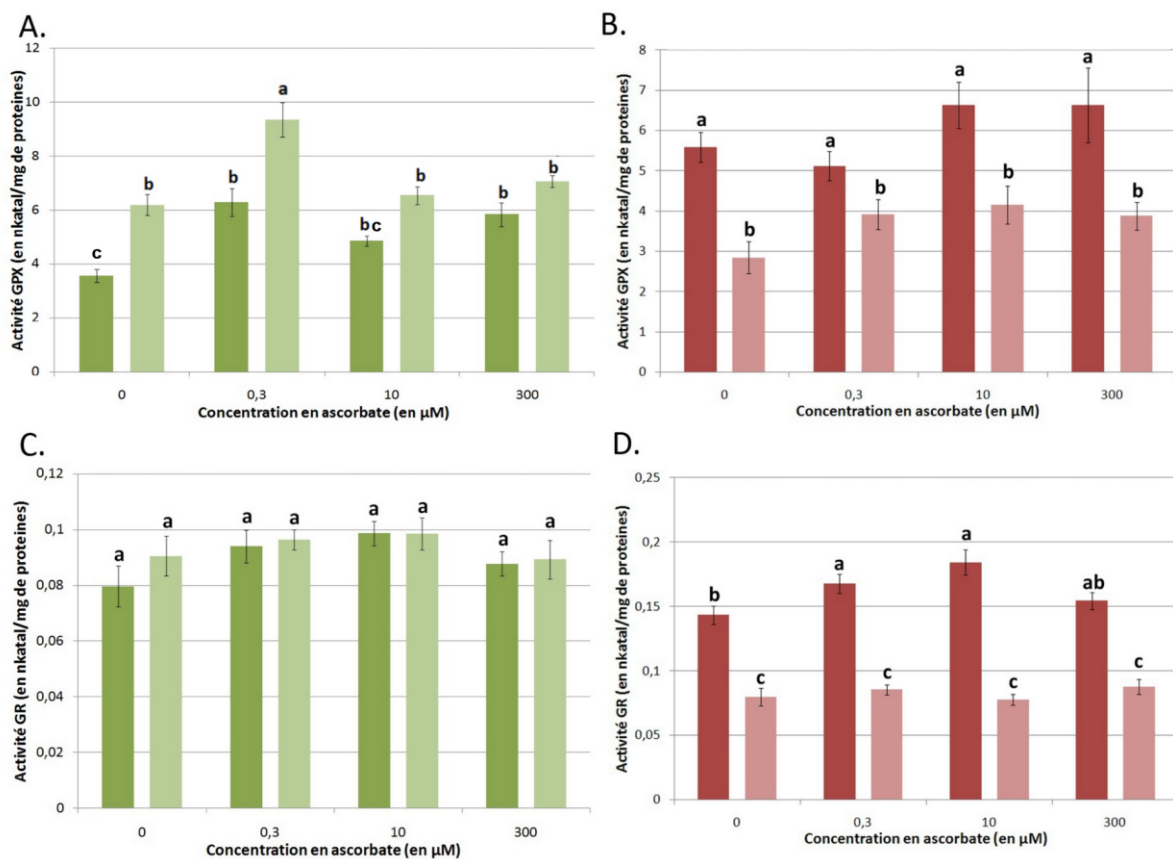


Figure 33 – Activités de la gaïacol peroxydase (A et B) et de la glutathion réductase (C et D) dans les parties aériennes (● : CT ; ● : Ir) et les racines (● : CT ; ● : Ir) d'*Allium cepa* pour différentes concentrations du milieu en ascorbate. Les radiations (10 Gy) sont appliquées 8<sup>ème</sup> jour de culture. CT = contrôle ; Ir = irradiation.

### 2.3.3.3. Activités GPX et GR après un apport exogène en Sinigrine

La concentration 0,3  $\mu\text{M}$  de sinigrine stimule l'activité GPX des parties aériennes et des racines (Figure 34 A,B), mais cette stimulation n'est pas cumulative avec celle provoquée par

l'irradiation. Par ailleurs, une concentration de 10  $\mu\text{M}$  diminue l'activité GPX des racines des plantes irradiées.

En l'absence d'irradiation, la sinigrine n'affecte pas l'activité GR des parties aériennes. L'ajout de sinigrine couplée à l'irradiation provoque une diminution progressive de l'activité GR significative à 300  $\mu\text{M}$  (Figure 34 C). Au niveau des racines, la concentration 10  $\mu\text{M}$  de sinigrine diminue l'activité GR, aussi bien chez les plantes irradiées que non irradiées (Figure 34 D).

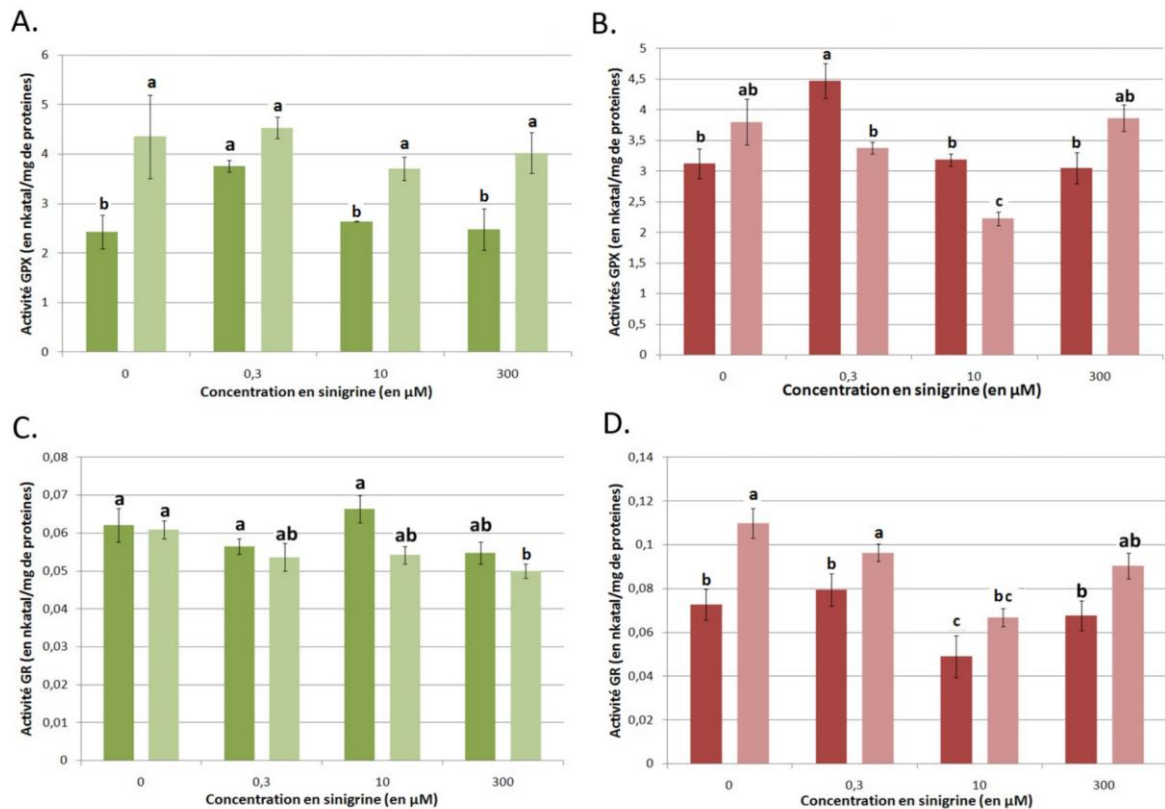


Figure 34 – Activités de la gaïacol peroxydase (A et B) et de la glutathion réductase (C et D) dans les parties aériennes (● : CT ; ● : Ir) et les racines (● : CT ; ● : Ir) d'*Allium cepa* pour différentes concentrations du milieu en sinigrine. Les radiations (10 Gy) sont appliquées 8<sup>ème</sup> jour de culture. CT = contrôle ; Ir = irradiation.

#### 2.3.3.4. Activités GPX et GR après un apport exogène en Indole-3-carbinol

En l'absence d'irradiation, l'apport d'I3C n'a pas d'effet sur les activités GPX et GR des parties aériennes (Figure 35 A,B). Néanmoins, le DMSO dans lequel a été dissout l'I3C, apporté seul, diminue significativement ces deux activités, ce qui suggérerait que l'ajout d'I3C dans le milieu contrebalancerait l'effet inhibiteur du DMSO sur la GPX et la GR des parties aériennes. Après irradiation, les concentrations croissantes en I3C inhibent l'augmentation de la GPX des parties aériennes normalement provoquée par la dose 10 Gy. Au niveau racinaire

l'apport d'I3C n'a pas d'effet sur l'activité GPX des plantes non irradiées mais diminue l'activité GPX après irradiation (10 et 300  $\mu\text{M}$ ). L'activité GR est stimulée au niveau des parties aériennes, après irradiation pour une concentration de 0,3  $\mu\text{M}$  d'I3C (Figure 35 C). Au niveau des racines, l'I3C seul inhibe clairement l'activité GR mais les concentrations 10 et 300  $\mu\text{M}$  n'aggravent pas la diminution de l'activité de la GR causée par l'irradiation (Figure 35 D).

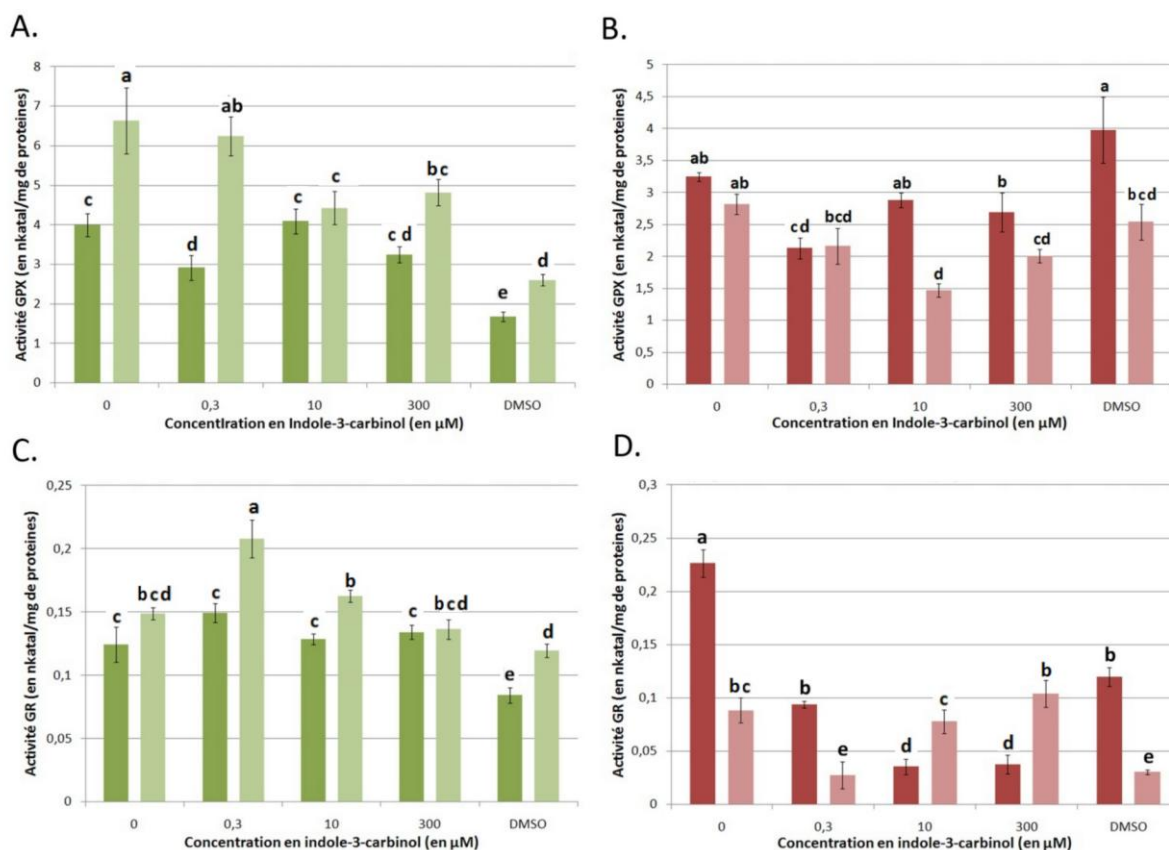


Figure 35 – Activités de la gaïacol peroxydase (A et B) et de la glutathion réductase (C et D) dans les parties aériennes (● : CT ; ● : Ir) et les racines (● : CT ; ● : Ir) d'*Allium cepa* pour différentes concentrations du milieu en indole-3-carbinol. Les radiations (10 Gy) sont appliquées 8<sup>ème</sup> jour de culture. CT = contrôle ; Ir = irradiation.

#### 2.3.4. Bilan des apports exogènes en glucosinolates sur des plantes non productrices

*Pisum sativum* et *Allium cepa* sont deux espèces d'intérêt agronomique dont la radiosensibilité, bien plus importante que celle d'*A. thaliana*, a déjà été mise en évidence. Bagi *et al.* (1988) ont montré une diminution de la taille de 50% des plantules de pois âgées de 4 jours après une irradiation à la dose 9,4 Gy et Zaka *et al.* (2004) ont montré une diminution de la taille (-19%) et du poids (-45%) des plantules de pois âgées de 5 jours après une irradiation à la dose 10 Gy. Par ailleurs, Carballo *et al.* (2006) ont mesuré une diminution

de la longueur racinaire d'*A. cepa* de 24% quatre jours après une irradiation des cultures à la dose 10 Gy. Les pertes de biomasse observées au travers de nos expériences sont donc en concordance avec les travaux précédents : la dose 15 Gy diminue les masses fraîches aériennes et racinaires de 37% et 49% en moyenne chez le pois et la dose 10 Gy les diminue de 5% et 68% en moyenne chez l'oignon. Dans nos conditions expérimentales, les réponses des parties aériennes et des racines sont donc plus équilibrée chez *P. sativum*, alors qu'*A. cepa* montre une sensibilité accrue des racines et un effet très faible sur les parties aériennes, qui n'est d'ailleurs jamais significatif. Par ailleurs, des perturbations morphologiques ont été observées sur les deux espèces après irradiation (inhibition des racines secondaires chez *P. sativum*, réduction du nombre de feuilles et formation plus fréquente de bulbes chez *A. cepa*). Ce type d'anomalie a été observé après irradiation sur d'autres espèces, comme l'inhibition des racines secondaires chez *A. thaliana*, la réduction du nombre de feuilles et du nombre de ramifications de celles-ci chez un *Pelargonium* (Grossman et Craig 1982), ou la réduction du nombre de feuilles et de racine ainsi que la formation de bulbes anormaux sur des gousses d'ail irradiées à la dose 10 Gy (Pellegrini *et al.* 2000).

Les effets des apports exogènes en GLSs et I3C sur le développement de *P. sativum* et *A. cepa* diffèrent entre ces deux espèces, toutes deux incapables de les synthétiser naturellement.

Globalement, dans ces expériences, les effets significatifs sur les biomasses sont mis en évidence pour certaines concentrations. Toutefois, certaines tendances sont visibles graphiquement mais non significatives statistiquement. Ceci peut être partiellement dû aux écart-types relativement élevés sur les séries étudiées. En effet, une variabilité assez forte des critères utilisés masquent parfois les faibles effets. Malgré cette variabilité, certains éléments ressortent (Tableau 11) :

- Les molécules testées ont très peu d'effet voire pas du tout sur l'oignon par rapport au pois
- L'effet sur le pois est globalement similaire entre parties aériennes et racinaires
- Chez le pois (sans différencier parties aériennes ou racines),
  - l'ascorbate a un effet inhibant s'il est associé à l'irradiation
  - la sinigrine stimule à 0,3  $\mu\text{M}$ , inhibe à 300  $\mu\text{M}$  ; elle compense les effets des irradiations
  - la glucobrassicine inhibe à 10 et 300  $\mu\text{M}$  ; elle compense les effets des irradiations



L'analyse des activités GPX et GR chez *A. cepa* en l'absence de tout apport exogène, montre qu'une irradiation à la dose 10 Gy provoque une augmentation de l'activité GPX des parties aériennes et une diminution de l'activité GR racinaire (GPX racinaire et GR des parties aériennes stables). D'autre part, les apports de molécules modulent cet effet des radiations (de manière assez ponctuelle) dans le sens où leur effet seul n'est pas simplement cumulatif avec celui des radiations mais interagit avec celui-ci.

### 3. Relation entre les teneurs en glucosinolates endogènes et la réponse à l'irradiation

Dans le cas d'un apport exogène, l'action d'une molécule est liée à sa pénétration, sa répartition et sa biodisponibilité dans la plante ce qui a pu générer un biais pour la mise en évidence du pouvoir protecteur des GLSs dans les expériences précédentes : le GLS ajouté est-il au bon endroit (organes, tissus) au bon moment (temps de transport dans la plante) ? Afin de contourner cette difficulté, l'effet des GLSs endogènes a été évalué après irradiation chez des écotypes d'*A. thaliana* de composition variable en GLS d'une part et chez des mutants pour les voies de synthèse des GLS d'autre part. Pour suivre ces écotypes et mutants en nombre important (60 plantes minimum par dose d'irradiations soit 14 expériences comprenant 5 doses d'irradiations pour les écotypes et 6 doses pour les mutants et WT correspondants), les critères simples liés à la croissance ont été utilisés.

#### ***3.1. Comparaison des effets des radiations ionisantes sur les marqueurs morphologiques d'un panel d'écotypes d'A. thaliana***

Cette partie du travail s'appuie sur deux études concernant le génotypage de certains écotypes naturels d'*A. thaliana* du point de vue de la voie de biosynthèse des GLSs et de leurs produits d'hydrolyse (Kliebenstein *et al.* 2001a, Lambrix *et al.* 2001). L'objectif est ici d'étudier le comportement de certains de ces écotypes bien caractérisés, face à des doses croissantes de radiations ionisantes appliquées au stade de développement 0.7 et de les comparer aux deux écotypes de référence Col-0 et Ler. Les neuf écotypes retenus ont été choisis en fonction de leurs teneurs remarquables en GLSs d'un point de vue quantitatif ou qualitatif. Par exemple, l'écotype Cvi-0 présente la teneur la plus importante en GLSs totaux (39,5  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de MS) alors que l'écotype Pi-0 a la teneur la plus faible en GLSs totaux (4,27  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de MS)<sup>6</sup>. Ces teneurs ont été mesurées pour les parties aériennes de plantules âgées de trois semaines par Kliebenstein *et al.* 2001a (Tableau 18 et 19 en Annexe 7).

Notre objectif était donc de déterminer si le comportement de ces écotypes après irradiation pouvait être relié à des teneurs particulières pour certains GLSs ou pour certaines familles de GLSs.

---

<sup>6</sup> Les écotypes Kondara (80% de sinigrine), Petergof (teneur maximum en GLS indoliques) et Oy-0 (produisant une majorité de méthylsulfinylpropylGLS), ont été testés mais les semences n'ont pas germé.

L'ensemble des écotypes est affecté par une irradiation au stade plantule à la dose 100 Gy ce qui se traduit par une diminution de la MF (Figure 36, Tableau 12). De plus, les écotypes *Ler*, *Tsu*, *Pi-0*, *Cvi-0* et *Hodja* se distinguent par une altération significative de la MF par rapport au témoin à des doses plus faibles, *Tsu* et *Cvi-0* dès 20 Gy, *Ler*, *Pi-0* et *Hodja* à 40 Gy.

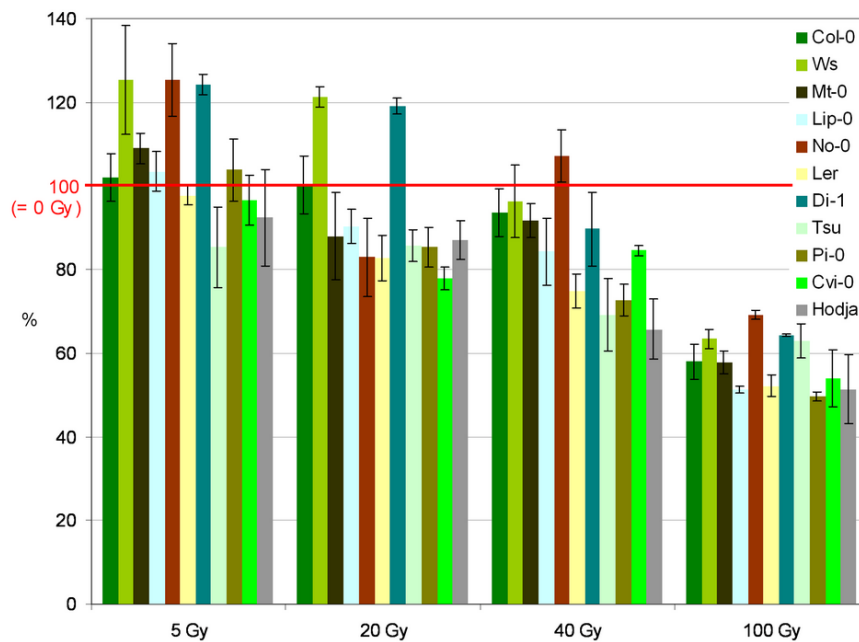


Figure 36 – Masse fraîche des parties aériennes des plantules d'*A. thaliana* dix jours après irradiation en fonction de la dose d'irradiation et de l'écotype, mesurée en mg/plante puis exprimée en pourcentage par rapport au témoin à 0 Gy (= 100%) pour chaque écotype.

Écotypes	0 Gy	5 Gy	20 Gy	40 Gy	100 Gy
Col-0	a	a	a	a	b *
Ws	a	a	a *	ab	b *
Mt-0	a	a	ab	a	b *
Lip-0	a	a	a	a	b *
No-0	abc	a	bc	ab	c *
Ler	a	ab	ab	bc *	c *
Di-1	ab	a	a	bc	c
Tsu	a	ab	ab *	b *	b *
Pi-0	a	a	ab	b *	c *
Cvi-0	a	ab	ab *	b *	c *
Hodja	a	a	a	a *	a *

Tableau 12 – Classement des moyennes (paramétriques ou non selon les séries) des masses fraîches des parties aériennes des plantules d'*A. thaliana* 10 jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes en fonction de l'écotype ; \* : significativement différentes de la condition 0 Gy (cf M&M, 9).

En considérant les longueurs racinaires à sept et dix j.a.t., on note trois comportements différents des écotypes en réponse aux différentes doses d'irradiation (Figures 37, 38 et Tableau 13).

Un premier groupe, constitué par *Tsu*, *Cvi-0* et *Hodja*, ralentit sa croissance racinaire dès la dose 5 Gy. L'effet dose dépendant de l'irradiation sur les longueurs des racines est clairement visible chez ces écotypes sept jours après irradiation et se reflète dans le classement des moyennes. Dix j.a.t, l'effet de la dose 5 Gy s'est estompé chez *Cvi-0*.

Un second groupe, constitué par *Col-0*, *Ws*, *Mt-0*, *Ler*, *Di-1* et *Pi-0*, diminue sa croissance racinaire de manière dose dépendante sept j.a.t., mais seulement à partir de la dose 20 Gy, la dose 5 Gy n'ayant aucun effet sur leur racines. A dix j.a.t, l'effet dès la dose 20 Gy est encore visible chez *Mt-0*, *Ler*, *Di-1* et *Pi-0* alors que *Col-0* et *Ws* ont récupéré une longueur racinaire normale.

Enfin, les écotypes *No-0* et *Lip-0* présentent un profil particulier avec une stimulation significative de la croissance racinaire à la dose 5 Gy qui est détectée sept et dix jours après l'irradiation. Pour les autres doses, l'effet sur les croissances racinaires est négatif à ces deux dates.

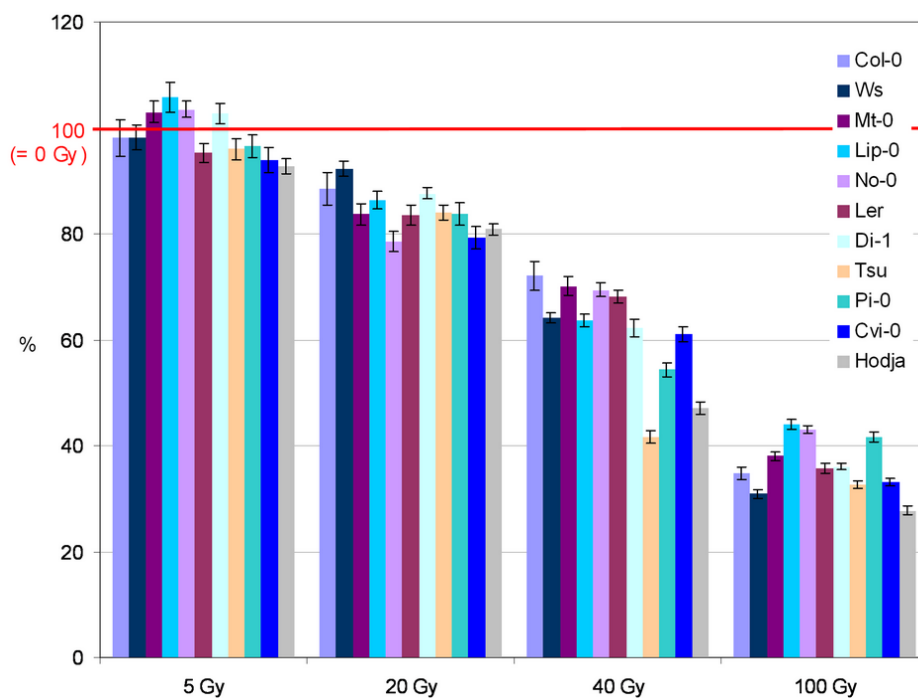


Figure 37 – Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* sept jours après irradiation en fonction de la dose d'irradiation et de l'écotype, mesurées en mm puis exprimées en pourcentage par rapport au témoins 0 Gy (= 100%).

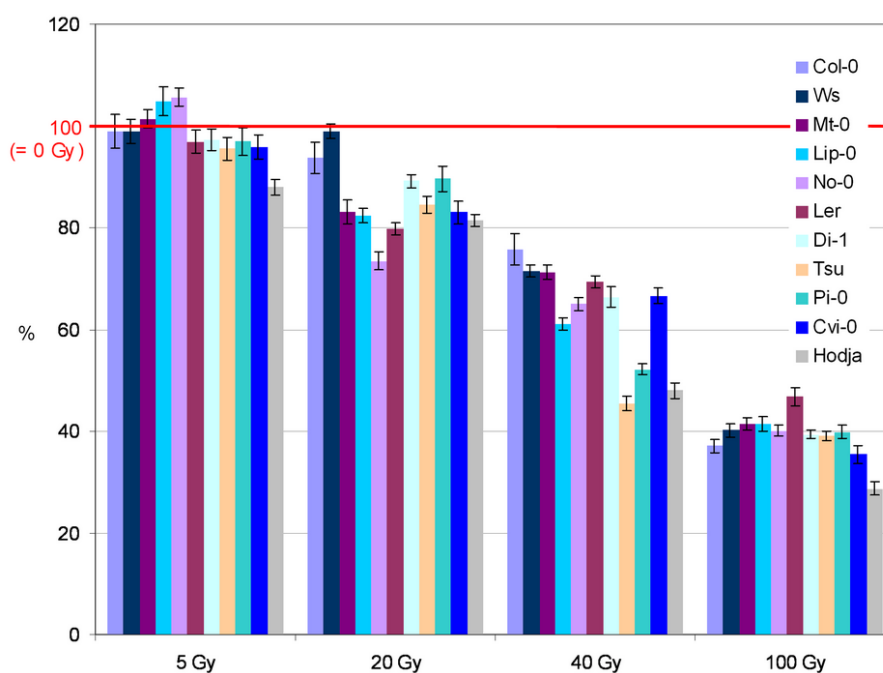


Figure 38 – Longueurs racinaires des plantules d’*A. thaliana* dix jours après irradiation en fonction de la dose d’irradiation et de l’écotype, mesurées en mm puis exprimées en pourcentage par rapport aux témoins 0 Gy (= 100%).

Tableau 13 – Classement des moyennes des longueurs racinaires des plantules d’*A. thaliana* avec correction de Bonferroni après test de Kruskal-Wallis significatifs, sept et dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes en fonction de l’écotype.

Ecotypes	Sept j.a.t	dix j.a.t					Sept j.a.t	dix j.a.t				
		0 Gy	5 Gy	20 Gy	40 Gy	100 Gy		0 Gy	5 Gy	20 Gy	40 Gy	100 Gy
Col-0	a	a	b	c	d	a	a	a	b	c		
Ws	a	a	b	c	d	a	a	a	b	c		
Mt-0	a	a	b	c	d	a	a	b	c	d		
Lip-0	b	a	c	d	e	b	a	c	d	e		
No-0	b	a	c	d	e	b	a	c	d	e		
Ler	a	a	b	c	d	a	a	b	c	d		
Di-1	a	a	b	c	d	a	a	b	c	d		
Tsu	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e		
Pi-0	a	a	b	c	d	a	ab	b	c	d		
Cvi-0	a	b	c	d	e	a	a	b	c	d		
Hodja	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e		

Malgré les résultats peu probants obtenus sur les teneurs en pigment après irradiation pour les écotypes Col-0 et *Ler* (cf Chapitre 1 – 1.2.), nous avons mesuré leurs teneurs pour tous ces écotypes car il s’agit d’un paramètre sensible aux RI pour de nombreux modèles végétaux. Pour tous ces écotypes, les doses de RI appliquées n’ont pas provoqué de modification significative des teneurs en pigments (résultats non présentés).

### 3.2. Comportement de mutants de la voie de biosynthèse des glucosinolates chez *A. thaliana*

Du fait de leur disponibilité dans les banques de données, les mutants de la voie des GLSs utilisés dans cette partie, ont des fonds génétiques différents. Les mutants *sur1* et *myb28* ont été obtenus à partir de l'écotype sauvage Col-0 alors que le double mutant *cyp79B2/B3* provient de l'écotype Ws (*cf* M&M – 1.2.). Ils sont irradiés au stade de développement 0.7.

Seule la dose 100 Gy provoque des diminutions significatives des masses fraîches et sèches des parties aériennes des plantules, détectables par test de Student ou de Welch par rapport au témoin 0 Gy, à l'exception du double mutant *cyp79B2/B3* (Ws) pour lequel aucune diminution de la MS n'est visible (Figures 39 et 40). La comparaison multiple des moyennes révèle également une augmentation de la MS des parties aériennes après exposition à la dose 5 Gy chez le mutant *sur1* (Col-0).

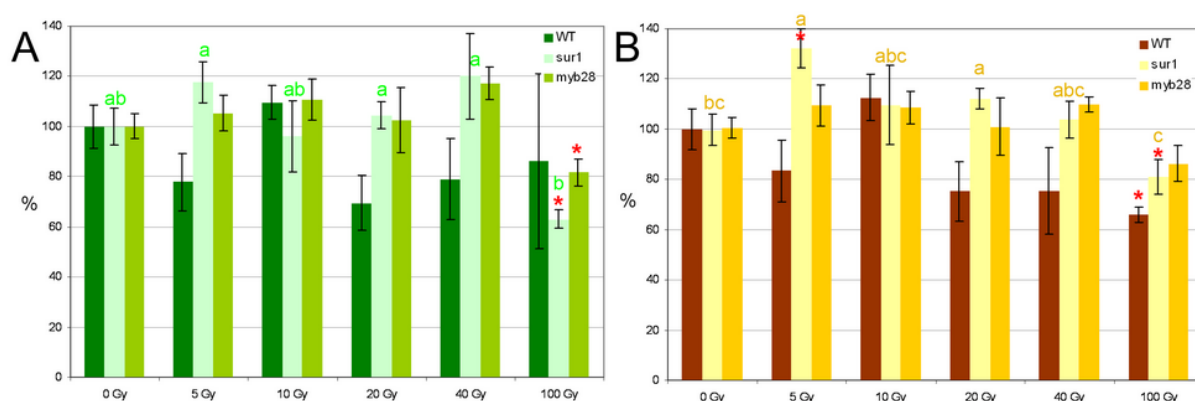
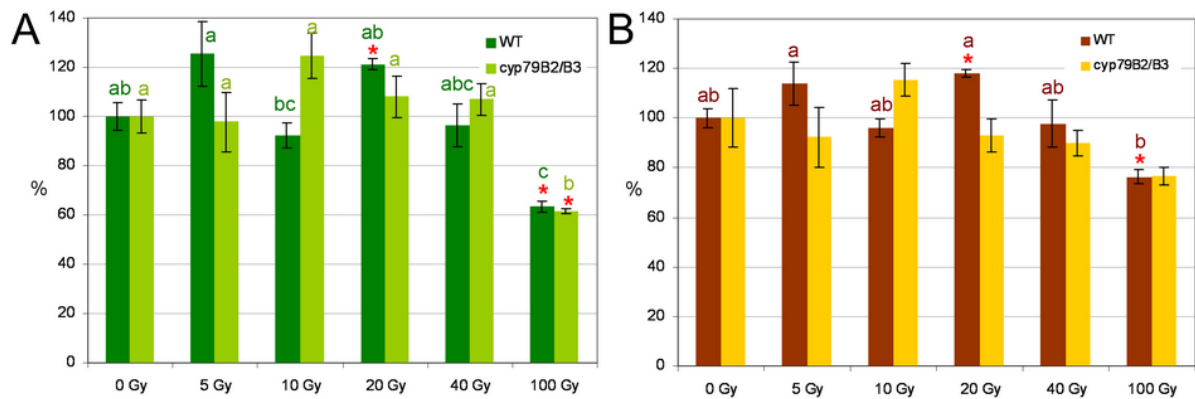
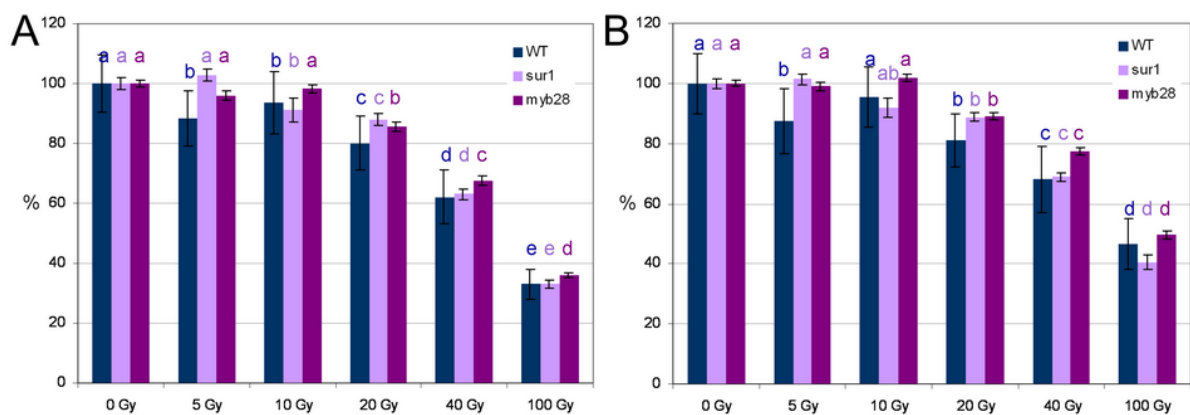


Figure 39 – Masses fraîches (A) et masses sèches (B) des parties aériennes de plantules d'*A. thaliana*, écotype WT (Col-0), mutants *sur1*(Col-0) et *myb28*(Col-0), dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. Le traitement est appliqué au stade 0.7. Les masses sont mesurées en mg/plante puis exprimées en pourcentage par rapport à la condition 0 Gy. Les lettres correspondent au classement des moyennes entre les doses d'irradiation chez un même type de plante (pas d'effet significatif sur les masses de Col-0 et *myb28*(Col-0) ; \* : significativement différent du contrôle 0 Gy (*cf* M&M – 11.).



**Figure 40 – Masses fraîches (A) et masses sèches (B) des parties aériennes de plantules d’*A. thaliana*, écotype WT(Ws) et double mutant *cyp79B2/B3*(Ws), dix jours après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. Le traitement est appliqué au stade 0.7. Les masses sont mesurées en mg/plante puis exprimées en pourcentage par rapport à la condition 0 Gy. Les lettres correspondent au classement des moyennes entre les doses d’irradiation chez un même type de plante (pas d’effet significatif sur la MS de *cyp79B2/B3*(Ws) ; \* : significativement différent du contrôle 0 Gy (cf M&M – 11.).**

L’analyse des croissances racinaires révèlent des différences de comportements entre les types sauvages et les mutants pour les doses d’irradiation les plus faibles. De manière générale, ces différences sont mieux discriminées sept jours après traitement qu’en fin d’expérience (10 j.a.t). Pour Col-0, le type sauvage montre des diminutions de longueur racinaire de 11,5% et de 6,5% pour les doses 5 Gy et 10 Gy sept j.a.t (Figure 41). Dix jours après irradiation, cette diminution est toujours significative pour la dose 5 Gy mais pas pour la dose 10 Gy pour laquelle les racines ont rattrapé leur retard de croissance.

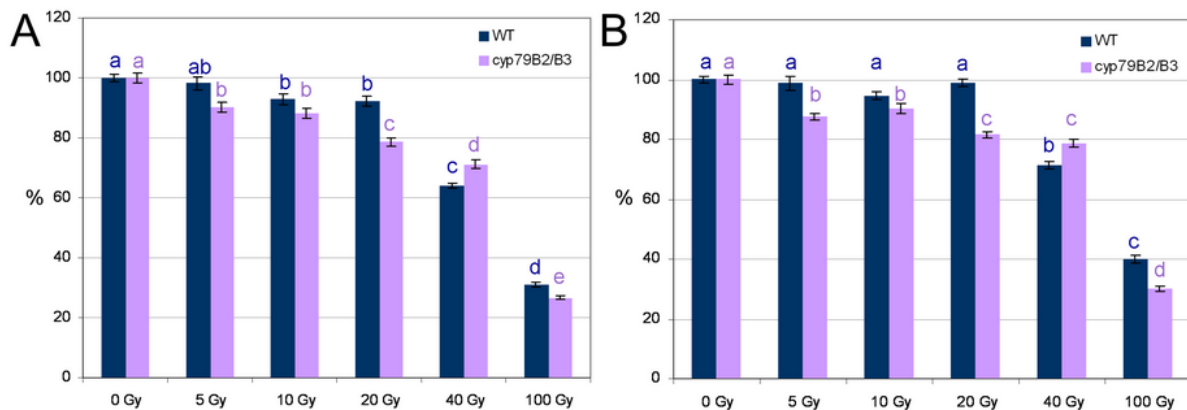


**Figure 41 – Longueurs racinaires des plantules d’*A. thaliana*, écotype Col-0, mutants *sur1*(Col-0) et *myb28*(Col-0), sept jours (A) et dix jours (B) après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. Le traitement est appliqué au stade 0.7. Les racines sont mesurées en mm puis exprimées en pourcentage par rapport à la condition 0 Gy. Les lettres correspondent au classement des moyennes entre les doses pour un même type de plante (cf M&M – 11.).**

Les deux mutants Col-0 présentent des sensibilités différentes du type sauvage ainsi qu’entre eux. Chez *sur1*, la diminution de croissance racinaire n’est significative qu’à partir

de la dose 10 Gy (- 9%) et chez *myb28*, elle n'est significative qu'à partir de 20 Gy (- 14,5%) (Figure 41). Les doses 40 Gy et 100 Gy ont des effets équivalents sur les trois types de plantes et provoquent des diminutions de longueurs de racine d'environ 65% sept j.a.t et de 50 à 60% dix j.a.t.

Chez les plantules de fond Ws, la croissance racinaire diminue de 7% et 8% sept jours après des irradiations de 10 Gy et 20 Gy respectivement pour le type sauvage (Figure 42). Toutefois, ces retards ne sont plus visibles dix j.a.t. En ce qui concerne le mutant *cyp79B2/B3*(Ws), la longueur racinaire est réduite de 10% dès la dose de 5 Gy sept et dix j.a.t., comparable à celle obtenue après 10 Gy.



**Figure 42 – Longueurs racinaires des plantules d’*A. thaliana*, écotype Ws et double mutant *cyp79B2B3*(Ws), sept jours (A) et dix jours (B) après exposition à différentes doses de radiations ionisantes. Le traitement est appliqué au stade 0.7. Les racines sont mesurées en mm puis exprimées en pourcentages par rapport à la condition 0 Gy. Les lettres correspondent au classement des moyennes entre les doses pour un même type de plante (cf M&M – 11.).**

### 3.3. Effet de l’irradiation sur les enzymes antioxydantes du mutant *sur1*(Col-0)

Une expérience supplémentaire a été menée sur le mutant *sur1* (fond génétique Col-0) irradié avec une dose de 40 Gy au stade de développement plus tardif 1.02 utilisé dans les études moléculaires du premier chapitre. Les deux études ayant révélé une activation des enzymes d’élimination des ROS à cette dose, il était intéressant d’étudier le comportement de la GPX, de la GR et de la SOD dans les parties aériennes pour ce stade, et l’éventuel effet croisé de la présence de la voie des GLSs. Le mutant *sur1*(Col-0) présente une croissance racinaire moindre que le type sauvage au 17<sup>ème</sup> jour de culture en l’absence d’irradiation (Figure 43). Après une irradiation à 40 Gy, la différence entre le type sauvage et le mutant *sur1* s’estompe.



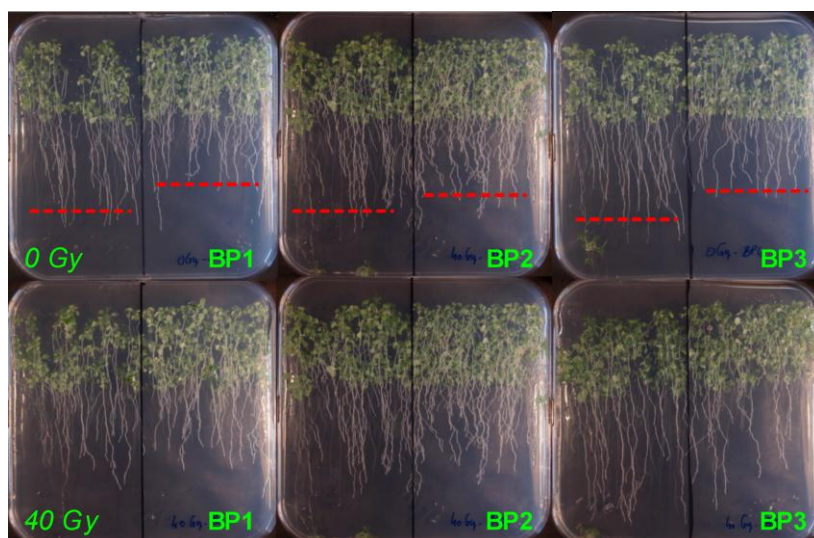
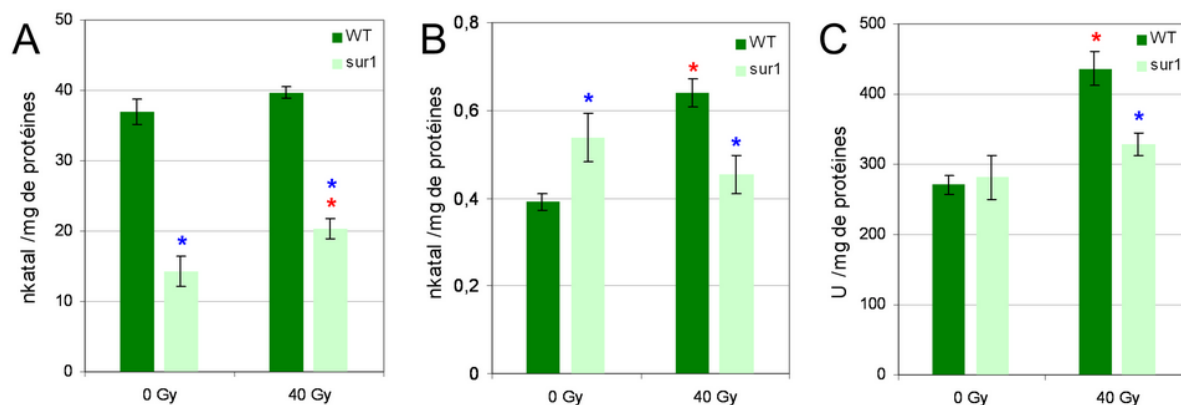


Figure 43 – Photographies de plantules d'*A. thaliana* écotype Col-0 WT (partie gauche des boîtes) et mutant *sur1*(Col-0) (partie droite des boîtes) au 17<sup>ème</sup> jour de culture après irradiation ou non au stade de développement 1.02. BP 1 à 3 : les trois répétitions.

En l'absence d'irradiation, le mutant *sur1* a une activité GPX 2,6 fois plus faible que le type sauvage et une activité GR 1,3 fois plus forte que ce dernier. Le niveau de l'activité SOD est équivalent chez les deux types de plantes (Figure 44). Après une irradiation de 40 Gy, les activités GR et SOD augmentent de 60% chez le type sauvage, alors qu'elles restent constantes chez le mutant *sur1*. L'irradiation provoque par contre une augmentation de 30% de l'activité GPX chez le mutant.



**Figure 44 – Activités enzymatiques (A) gaiacol peroxydase (GPX), (B) glutathion réductase (GR) et (C) superoxyde dismutase (SOD) dans les parties aériennes de plantules d' *A. thaliana* sept jours après exposition à une dose de radiations ionisantes de 40 Gy chez l'écotype Col-0 sauvage (WT) et chez le mutant *sur1*(Col-0). Le traitement est appliqué au stade 1.02. \* : significativement différent du témoin non irradié correspondant ; \* : significativement différent du type sauvage pour une même condition d'irradiation (GPX : test de Student ; GR et SOD : test de Welch).**

### 3.3. Discussion

Cette approche sur 11 écotypes et 3 mutants a permis de révéler des différences de sensibilité après irradiation en utilisant des critères simples tels que les masses fraîches et les croissances racinaires.

La plus grande sensibilité aux radiations concernent les écotypes *Tsu*, *Hodja*, *Pi-0*, *Cvi-0* et *Ler* (Tableau 14 : MF de *Tsu* et *Cvi* sensibles dès 20 Gy ; MF de *Ler*, *Pi-0* et *Hodja* sensibles dès 40 Gy ; racines de *Tsu*, *Cvi* et *Hodja* sensibles dès 5 Gy ; racines de *Mt-0*, *Di-0* et *Pi-0* sensibles dès 20 Gy).

Parmi eux, *Ler*, *Pi-0* et *Tsu* possèdent tous les trois la combinaison d'allèles  $C_3$ -*Ohp* qui conduit majoritairement à la production d'hydroxypropyl-GLS. Par ailleurs, *Ler*, *Cvi-0* et *Hodja* possèdent l'allèle  $ESP^+$  qui oriente l'hydrolyse des GLSs vers la production de dérivés nitriles (non déterminé pour *Tsu* et *Pi-0*).

En se référant aux teneurs mesurées par Kliebenstein *et al.* (2001a), les deux écotypes les plus sensibles, *Tsu* et *Cvi-0*, présentent des teneurs importantes en GLSs. En effet, *Cvi-0* a les teneurs les plus élevées en GLSs totaux et en GLSs aliphatiques dans les feuilles de plantules de trois semaines (Annexe 7). *Tsu* présente les teneurs les plus élevées en GLSs totaux et en aliphatiques dans les graines. Les plantes étant analysées au stade de 14 jours de culture, temps intermédiaire par rapport aux deux stades étudiés par Kliebenstein *et al.*, les deux écotypes *Tsu* et *Cvi-0* présentent vraisemblablement des teneurs élevées en GLSs. D'après les

données de Kliebenstein, Tsu contient majoritairement de la glucoiberverine dans la graine (écotype dont la teneur est maximale) et Cvi-0 contient majoritairement de la gluconapine (3-butenyl), de la glucoérucine (4-méthylthiobutyl) et du 8-méthylthiooctyl (Tableau 15), ce qui laisserait présumer d'un effet plutôt négatif des fortes teneurs en GLSs dans la réponse développementale de la plante face aux radiations.

Les écotypes No-0 et Lip-0 qui présentent une stimulation de la croissance racinaire en réponse à la dose 5 Gy possèdent la combinaison d'allèles C3-Ohp qui aboutit à la production majoritaire d'hydroxypropyl-GLSs mais cette combinaison est également présente chez *Ler*, *Pi-0* et *Tsu* pour qui cette stimulation n'est pas observée (la croissance racinaire de *Tsu* est inhibée à 5 Gy). La production d'hydroxypropyl-GLSs n'explique pas cet effet positif, pas plus que l'orientation de l'hydrolyse des GLSs chez ces écotypes, No-0 produisant plutôt des ITC et Lip-0 plutôt des nitriles (*cf* Annexe 7 et Introduction générale – Figure 7).

**Tableau 14 – Effets positifs (+) et négatifs (-) des radiations ionisantes sur le développement des plantules de différents écotypes naturels d'*A. thaliana* sept et dix jours après exposition à différentes doses d'irradiation. R : longueur racinaire ; MF : masse fraîche des parties aériennes ; MS : masse sèche des parties aériennes ; (7 j.a.t) : effet observé sept jours après traitement seulement.**

	Col-0	Ws	Mt-0	Di-1	Ler	Pi-0	Cvi-0	Tsu	Hodja	No-0	Lip-0
<b>5 Gy</b>							R - (7 j.a.t)	R -	R -	R +	R +
<b>20 Gy</b>							MF -	MF -			
	R - (7 j.a.t)	R - (7 j.a.t)	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -
<b>40 Gy</b>					MF -	MF -	MF -	MF -	MF -		
	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -
<b>100 Gy</b>	MF -	MF -	MF -	MF -	MF -	MF -	MF -	MF -	MF -	MF -	MF -
	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -	R -

**Tableau 15 – Teneurs relatives (%) en glucosinolates dans les feuilles de plantules de trois semaines et dans les graines de certains écotypes naturels d’*A. thaliana* mesurés par Kliebenstein *et al.* 2001a (cf Annexe 7 pour les teneurs absolues).**

GLS	3-hydroxypropyl	3-methylsulfinylpropyl = Glucoibérine	4-hydroxybutyl	4-methylsulfinylbutyl = Glucoraphanine	allyl = Sinigrine	3-butenyl = Gluconapine	3-methylthiopropyl = Glucoibervérine	7-methylsulfinylheptyl = Glucoibarine	4-methylthiobutyl = Glucoerucine	8-methylsulfinyloctyl	indolyl-3-méthyl = Glucobrassicine	4-méthoxy-indolyl-3-méthyl = 4-Méthoxyglucobrassicine	6-méthylthiohexyl = Glucosquerelline	1-méthoxy-indolyl-3-méthyl = Néoglucobrassicine
<b>Feuilles</b>														
Cvi-0	0,0	0,0	-	0,0	25,4	61,8	0,0	0,7	0,0	5,7	2,7	0,5	-	1,0
Hodja	0,0	0,0	-	0,0	81,7	1,1	0,0	0,0	0,0	3,8	7,2	1,0	-	3,1
Tsu-1	46,1	5,5	-	0,4	0,0	0,2	1,9	0,8	0,4	10,0	24,6	1,3	-	4,5
Di-1	15,5	0,3	-	31,3	0,0	0,0	0,0	2,1	4,4	10,7	24,4	3,8	-	4,8
Col-0	0,0	3,2	-	43,0	0,3	0,0	0,0	1,4	8,4	8,6	25,0	2,7	-	5,4
Mt-0	0,0	0,0	-	40,3	0,0	0,0	0,0	1,5	3,0	11,4	28,5	5,3	-	7,9
No-0	62,6	2,9	-	0,7	0,0	0,0	0,8	0,3	0,3	7,6	15,4	1,6	-	2,8
Pi-0	48,5	0,0	-	1,9	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	15,0	21,8	1,2	-	10,8
Ler	65,3	1,2	-	0,1	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	9,5	14,0	1,5	-	5,1
Lip-0	50,9	6,7	-	0,0	0,0	0,0	0,4	0,8	0,0	10,3	17,1	3,3	-	7,5
<b>Graines</b>														
Cvi-0	1,4	0,0	0,0	0,0	3,6	12,5	0,3	1,2	15,2	17,2	0,5	-	0,3	-
Hodja	8,1	5,0	0,0	0,0	27,2	0,5	24,5	0,4	0,9	9,3	2,4	-	0,0	-
Tsu-1	9,4	14,5	0,0	0,0	0,0	0,0	37,7	0,7	1,8	9,6	0,8	-	0,0	-
Di-1	2,9	0,0	0,0	2,3	0,4	0,0	0,9	2,0	41,2	16,6	0,8	-	1,2	-
Col-0	2,0	0,0	6,3	5,4	0,0	0,0	0,2	1,6	54,4	7,9	2,3	-	3,0	-
Mt-0	1,5	0,0	5,9	2,9	0,0	0,0	0,4	1,3	52,6	10,3	2,4	-	1,9	-
No-0	40,5	1,4	0,0	0,8	0,0	0,0	19,5	0,5	1,5	8,5	0,8	-	0,3	-
Pi-0	17,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,4	3,8	12,6	4,6	-	0,4	-
Ler	31,3	0,8	0,0	0,0	0,5	0,0	11,0	0,4	1,4	12,7	0,4	-	0,0	-
Lip-0	19,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,5	3,2	11,5	0,9	-	0,4	-

Les mutants de gènes de la voie des GLSs ont été choisis afin d’étudier un lien possible entre la nature aliphatique ou indolique des GLSs dans la radiosensibilité. Il y a peu de différence entre le développement des plantes du type sauvage Col-0 et le mutant *sur1* correspondant qui ne produit pas de GLSs, si ce n’est une augmentation de la MS à 5 Gy (Tableau 16). Si on s’en tient aux critères morphologiques, les GLSs ne seraient pas impliqués dans la résistance aux radiations pour les conditions utilisées. Par ailleurs, le mutant *myb28* qui ne produit pas de GLSs aliphatiques, a un seuil de radiosensibilité plus élevé que le type sauvage au niveau de sa croissance racinaire. Sur ce fond génétique, l’absence quasi-totale de

GLS ou de GLS aliphatiques uniquement n'aggrave pas la sensibilité aux radiations voir l'améliore.

A contrario, les observations comparatives menées sur le mutant Ws *cyp79B2/B3* et le type sauvage Ws montrent une plus grande sensibilité du mutant déplété en GLSs indoliques, suggérant ainsi un rôle de ces derniers dans la lutte contre le stress oxydant généré par les radiations. La différence de comportement des deux types de plante au niveau racinaire réside notamment dans l'absence de la récupération d'une croissance normale dix jours après 10 Gy et 20 Gy chez le mutant.

**Tableau 16 – Effets positifs (+) et négatifs (-) des radiations ionisantes sur le développement des plantules de différents mutants d'*A. thaliana* sept et dix jours après exposition à différentes doses d'irradiation. R : longueur racinaire ; MF : masse fraîche des parties aériennes ; MS : masse sèche des parties aériennes ; (7 j.a.t) : effet observé sept jours après traitement seulement.**

	Fond génétique Col-0			Fond génétique Ws	
	WT	<i>Sur1</i>	<i>Myb28</i>	WT	<i>Cyp79B2/B3</i>
<b>5 Gy</b>	R –	MS +			R –
<b>10 Gy</b>	R – (7 j.a.t)	R –		R – (7 j.a.t)	R –
<b>20 Gy</b>	R –	R –	R –	R – (7 j.a.t)	R –
<b>40 Gy</b>	R –	R –	R –	R –	R –
<b>100 Gy</b>	MF égale	MF –	MF –	MF –	MF –
	MS –	MS –	MS égale	MS –	MS égale
	R –	R –	R –	R –	R –

#### 4. Discussion

Ce chapitre avait pour objectif d'évaluer le potentiel des glucosinolates dans la réponse des plantes aux rayonnements ionisants. Outre l'effet direct des RI sur les macromolécules, essentiellement l'ADN, ceux-ci génèrent un stress oxydant important souvent considéré comme l'effet majeur. L'effet indirect lié à la production des  $\bullet\text{OH}$  agit également sur les macromolécules. Il était donc intéressant d'évaluer l'impact de molécules antioxydantes dans la réponse aux RI. En tant que référence, cette activité antioxydante a également été évaluée *in vitro*.

L'étude de la capacité antioxydante mesurée *in vitro* par la méthode ORAC, qui est la plus appropriée pour mimer les phénomènes opérant *in vivo*, a mis en évidence un fort potentiel antioxydant de la glucobrassicine, et dans une moindre mesure de la glucoibérine et de la gluconapine. Par ailleurs, les hydrolysats enzymatiques des GLSs par la myrosinase se sont révélés de meilleurs antioxydants que les GLS d'origine. Enfin, l'action antioxydante de deux GLSs testés ensemble correspond à la somme des activités antioxydantes mesurées pour chacun d'eux sans effet de synergie ou d'antagonisme.

Par la suite, grâce à l'exploration du rôle antioxydant de ces GLSs *in vivo* par les deux approches expérimentales simples (apport exogènes de GLSs dans le milieu de culture de plantes irradiées et étude du comportement de différents géotypes d'*A. thaliana* face aux radiations) ces résultats peuvent être nuancés. Les paramètres de croissance retenus ont l'inconvénient de manquer de finesse pour mettre en évidence une éventuelle protection par les molécules antioxydantes face aux radiations ionisantes. En effet, les variations mises en évidence correspondent à de très faibles effets de diminution/augmentation de la masse fraîche, souvent peu significatif statistiquement. C'est toutefois, au travers de la masse des données que se dégagent certains éléments.

Les trois modèles végétaux utilisés se sont comportés différemment au travers de ces expériences, d'où l'intérêt d'en choisir plusieurs. Seul *P. sativum* s'est révélé avoir un comportement assez sensible pour montrer un effet en réponse aux apports d'antioxydants dans le milieu de culture, ce qui peut être mis en relation avec la sensibilité du pois aux radiations ionisantes. *A. thaliana* comme l'oignon réagissent très peu aux apports dans le milieu. Ce résultat pourrait être lié à la présence de métabolites endogènes comme les GLS endogènes pour *Arabidopsis*. Toutefois, d'autres molécules antioxydantes chez les Brassicaceae telles que la vitamine C, les composés phénoliques, les caroténoïdes ou la

vitamine E (Podsedek 2007) sont présentes. De même chez l'oignon l'activité antioxydante des graines à déjà été démontrée et est due à la présence de molécules protectrices connues dans les graines (Dini *et al.* 2008).

Un résultat marquant de cette étude concerne la dualité des effets (positif ou négatif) de certaines molécules ajoutées en fonction de leur concentration. Ainsi, l'ascorbate (vitamine C) réputé comme un très bon antioxydant n'a pas d'effet positif sur le développement d'*A. thaliana* et du pois aux concentrations utilisées, une baisse de la masse fraîche étant même relevée pour les fortes concentrations (300  $\mu\text{M}$ ). Diverses publications démontrent également cet effet cytotoxique de l'ascorbate (Andersson *et al.* 1995 ; Singh 1997) ; il peut notamment former un radical et devenir pro-oxydant en présence d'ions métalliques (par exemple  $\text{Fe}^{3+}$ ). Cette toxicité a pu être mise en évidence sur certains tissus animaux (Song *et al.* 2001 ; Martin *et al.* 2006). De manière similaire, la sinigrine a induit un effet positif pour de faibles concentrations et un effet toxique pour les concentrations plus élevées chez *Arabidopsis* et *Pisum*. Ces deux effets ont déjà été décrits pour la sinigrine. Ainsi, Zhu et Loft (2001) ont montré que l'ajout de 5  $\mu\text{M}$  de sinigrine dans une culture de lymphocytes humains exposés à un stress oxydant généré par de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , réduit les cassures de l'ADN. A l'opposé, une concentration de 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  pourrait provoquer des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs dans des cellules de type CHO (Musk *et al.* 1995). D'autre part, ces résultats peuvent être mis en relation avec l'effet positif observé à faible concentration chez *P. sativum*, malgré un pouvoir antioxydant non démontré *in vitro*. Aussi, il n'est pas exclu que d'autres molécules comme la glucoraphanine ou la glucotropaeoline qui ont ici un effet toujours du même type (soit positif soit négatif) chez *Arabidopsis* puissent avoir un effet contraire pour des concentrations non testées.

Un résultat surprenant concerne la glucobrassicine. Son activité antioxydante mesurée *in vitro* (2,9) laissait présager un effet intéressant *in vivo* ce qui n'a pas été le cas. Au contraire, un effet inhibiteur a été mis en évidence à certaines concentrations chez le pois ou l'oignon. Là encore, on peut s'interroger sur le choix des concentrations utilisées mais dans tous les cas, ce résultat démontre qu'il est nécessaire d'être prudent dans l'interprétation de ce type de données. De manière identique, son dérivé, l'I3C a un fort effet négatif sur le développement d'*A. thaliana* à forte concentration et n'a par contre aucun effet sur les plantes non-productrices de GLSs. Toutefois, la présence de DMSO masque peut être partiellement l'effet de l'I3C.

Certaines molécules pourraient avoir un rôle possible de radioprotection. En effet, l'ajout de molécules antioxydantes couplé au déclenchement du stress oxydant par l'irradiation a donné pour la sinigrine, la glucobrassicine et son dérivé, l'I3C un pourcentage de biomasse relative Ir/CT croissant. Ceci pourrait être dû à un effet protecteur face à l'irradiation, même si la possibilité d'un effet toxique non cumulatif avec celui des irradiations est aussi à considérer.

L'étude du comportement des écotypes d'*A. thaliana* face aux radiations a révélé trois écotypes plus sensibles aux RI (Tsu, Hodja et Cvi). Cette sensibilité ne peut pas être mise en relation avec le génotype, ni du point de vue de la production, ni de celui l'hydrolyse des GLSs. Par contre, les fortes teneurs en GLSs endogènes semblent avoir un effet plutôt négatif sur la tolérance aux RI, Tsu et Cvi-0 présentant des teneurs élevées en GLSs totaux d'après les travaux réalisés par Kliebenstein *et al.* (2001a). Toujours d'après ces travaux, Cvi-0 et Hodja sont caractérisés par des teneurs relatives importantes en sinigrine et gluconapine dans les graines et les feuilles de plantules. La sinigrine pourrait participer à la sensibilité des ces écotypes au vue des effets toxiques des fortes concentrations mis en évidence par les apports exogènes chez *Arabidopsis*. Un argument supplémentaire vient des mutants, *sur-1* qui ne produit pas de GLSs et *myb28* qui ne produit pas de GLSs aliphatiques. Ces deux mutants sont plutôt moins sensibles que l'écotype sauvage Col-0, aux radiations ionisantes (*cf.* Chapitre 2-3.2). Ces données sont en accord avec les effets opposés des faibles et fortes concentrations en sinigrine démontrés par les apports exogènes.

Par ailleurs, les deux écotypes, Cvi-0 et Hodja ont les teneurs relatives les plus faibles en glucobrassicine dans les feuilles. La question de l'effet de la glucobrassicine reste posée compte tenu de sa capacité antioxydante mesurée *in vitro* et de sa possible radioprotection sur les pois irradiés. Toutefois, le double mutant *CYP79B2/B3* qui ne produit pas de GLSs indoliques ne semble pas plus sensible que l'écotype sauvage (Ws).

Pour certains écotypes, les faibles doses de rayonnements ionisants ont eu un effet stimulant sur la croissance. A plusieurs reprises, les auteurs ont décrits des effets stimulants des faibles doses de RI. Chez *Arabidopsis*, le suivi de la croissance racinaire a montré une induction à 10 Gy non significative pour l'écotype *Ler* et significatif pour Col-0 (Chapitre 1 - 1.2.2). Cette induction est transitoire puisqu'elle disparaît par la suite. A 5 Gy, cette stimulation n'a pas été détectée pour ces 2 écotypes (Chapitre 2 – 3.1). Par contre, on la



retrouve pour les écotypes No-0 et Lip-0. Ces résultats démontrent bien, s'il en était besoin, la complexité de ces effets stimulants qui ont souvent été démontrés sur du court terme. Si on se place sur le plan de la composition en GLS, No-0 et Lip-0 possèdent tous les deux des teneurs relatives élevées en 3-hydroxypropylGLS dans les graines. Ils sont dans le groupe des écotypes les plus résistants aux RI ainsi que Col-0, Di-1 et Mt-0. Ces 3 derniers ont de fortes teneurs relatives en glucoérucine, glucoibarine et glucoraphanine dans les graines et dans les feuilles. Dans l'étude *in vitro*, la glucoraphanine donne une capacité antioxydante importante par la méthode SRSA. Ajoutée dans le milieu, elle stimule la croissance racinaire de Col-0 (2.2.1). De plus, l'activité antioxydante directe de la glucoérucine vis à vis du peroxide d'hydrogène génèrerait de la glucoraphanine (Barillari *et al.*, 2005b). Ces 3 écotypes possèdent également les teneurs relatives les plus élevées en glucolesquerelline dans les graines et en 4-méthoxyglucobrassicine dans les feuilles. Il faut également rappeler que la glucoraphanine est le GLS précurseur du sulforaphane obtenu après action de la myrosinase et que le sulforaphane est le dérivé le plus étudié pour ses effets potentiellement anticancéreux.



## Conclusion générale et perspectives

---

L'objectif de cette thèse était double. La première partie devait permettre de comprendre la réponse d'*Arabidopsis thaliana* aux radiations ionisantes en fonction des doses utilisées. Après avoir identifié les effets majeurs sur la croissance de la plante, c'est une approche de génomique fonctionnelle qui a été retenue afin d'avoir une vue d'ensemble des impacts des RI sur les voies métaboliques. Ensuite, il s'agissait d'évaluer la modulation de la réponse aux RI par les glucosinolates en testant l'hypothèse d'un rôle antioxydant des glucosinolates. Cette deuxième partie par laquelle nous avons commencé dans les faits, s'est basée sur l'hypothèse que la composition en glucosinolates endogènes ou leur apport dans le milieu de culture pouvaient avoir une influence sur le stress oxydant généré par les radiations et donc sur la réponse des plantes aux RI.

Les résultats des deux études « omics » sur la réponse aux radiations ionisantes ouvrent des perspectives de recherche sur les acteurs contrôlant la réponse de la plante en fonction de l'intensité stress subi d'une part, et des voies métaboliques secondaires potentiellement productrices de composés antioxydants d'autre part.

En effet, les doses de RI appliquées dans ces analyses permettent d'observer deux réponses différentes confirmées par les deux approches. La dose 10 Gy conduit à une acclimatation du métabolisme énergétique couplée à l'activation de voies de biosynthèse de métabolites secondaires antioxydants. La dose 40 Gy déclenche la transcription de protéines de protection et des systèmes enzymatiques d'élimination des radicaux libres qui régissent l'équilibre redox de la cellule. L'ensemble agit comme un commutateur : au delà d'un certain seuil d'oxydation non gérable par le système, la production de ROS pour la sénescence, la remobilisation des nutriments et l'apoptose sont amorcés. Certains indicateurs apparaissent à 40 Gy dans l'étude du transcriptome. Notre travail a notamment mis en évidence des éléments de contrôle de ce basculement tels que *EDS1*, *SAG101*, *PAD4*, *ATL55* et *NUDT7*. L'étape suivante serait de réaliser une étude de transcriptomique comparative entre le type sauvage d'*A. thaliana* et des mutants homozygotes déplétés dans ces gènes après irradiation à 40 Gy. De plus, aux vues de nos résultats, il serait intéressant de faire également la comparaison avec un mutant déplété dans la synthèse de l'éthylène afin de déterminer quelles sont les régulations régies par cette hormone après irradiation.

Par ailleurs, pour conforter l'hypothèse d'une activation des voies de biosynthèse des GLSs et des flavonoïdes à 10 Gy, il conviendrait de réaliser un profilage métabolique des produits (précurseurs, intermédiaires et finaux) issus de ces voies, en effectuant des dosages cinétiques des GLSs, de leurs dérivés et des flavonoïdes.

Ce sont principalement ces données moléculaires qui apportent des éléments sur le pouvoir antioxydant des GLSs à l'étude. Les expériences d'apports exogènes en GLSs et l'étude des écotypes n'ont conduit à aucune conclusion nette concernant l'effet protecteur antioxydant des GLSs. Ils n'infirmement ni ne confirment l'hypothèse de départ. Malgré tout, un résultat marquant porte sur la dualité d'au moins certains d'entre eux en fonction de la concentration utilisée. Cette dualité explique certainement pour partie la difficulté à mettre en évidence des effets nets. Par ailleurs, les marqueurs simples (croissance racinaire et enzymes antioxydantes) choisis afin d'explorer rapidement les effets d'un maximum de situations/molécules, sont plutôt des marqueurs de toxicité aiguë et obligent à l'application d'une dose affectant la croissance de la plante, c'est à dire 40 Gy. Or, l'approche de génomique fonctionnelle a montré que les voies de biosynthèse et d'hydrolyse des GLSs sont surtout régulées après la dose 10 Gy. Aussi, les GLSs sont donc plus susceptibles d'être protecteur aux faibles doses. A 40 Gy, les GLSs ne sont pas impliqués. Par contre, l'activation des enzymes antioxydantes est un marqueur de la dose 40 Gy. De plus, l'activation des activités GPX et GR pour certains apports exogènes sur *A. cepa* est difficile à interpréter car deux explications opposées sont suggérées par la littérature. En effet, l'augmentation d'une de ces activités suite à un apport exogène peut traduire un stress causé par la molécule comme il peut être le signe d'une activation préventive bénéfique des défenses antioxydantes qui renforcera la plante lors de l'irradiation (ce qui semble être le cas pour certaines molécules comme la glucoraphanine sur *A. thaliana*, ou la glucobrassicine sur *P. sativum*).

La démonstration des effets positifs des GLSs nécessitera donc un changement des conditions de travail, en utilisant des doses plus faibles et des expositions chroniques. De plus, l'utilisation de doses n'affectant pas la croissance nécessitera également un perfectionnement des marqueurs utilisés afin de détecter des effets non visibles. Les études moléculaires du premier chapitre permettent amplement de choisir des gènes marqueurs de l'irradiation qui pourraient être suivi par exemple par PCR quantitative. Il serait judicieux de choisir par exemple dans la liste des gènes de réparation de l'ADN ou de régulation du cycle cellulaire qui sont surexprimés quelque soit la dose appliquée, les dégâts sur l'ADN étant inévitables en cas d'irradiation. Les facteurs de transcription dont la transcription est ATM-

dépendante serait également pertinent ou bien le régulateur du cycle cellulaire RACK1A mis en évidence par la protéomique.

La valorisation des GLSs, facilement extractibles des sous-produits des cultures de Brassicaceae, comme antioxydant doit donc s'orienter vers la défense contre des stress de faible dose voire chroniques. Il conviendra d'approfondir l'identification des GLSs ayant des effets positifs significatifs sur les plantes en repensant la méthode en fonction des critères sus-cités, puis de les tester également sur des modèles de cellules humaines dans la perspective d'une utilisation dans le domaine de la santé. Cependant, la radioprotection qu'ils offrent orientera plutôt leur utilisation comme antioxydant préventif à faible dose dans le cadre de la phytothérapie par exemple. Etant donné les résultats des apports exogènes, il paraît également attrayant de les tester comme éliciteur des défenses naturelles des cultures à faible dose, les effets de certains GLS ou dérivés sur cellules animales étant souvent indirects et consistant également dans l'activation des défenses de la cellules (Fahey *et al.* 1999).



## Références bibliographiques

---

- Abdull Razis AF**, Bagatta M, De Nicola GR, Iori R, Ioannides C. Induction of epoxide hydrolase and glucuronosyl transferase by isothiocyanates and intact glucosinolates in precision-cut rat liver slices: importance of side-chain substituent and chirality. *Arch Toxicol* 2011a;85:919–27.
- Abdull Razis AF**, Bagattab M, De Nicolab GR, Iori R, Ioannidesa C. Up-regulation of cytochrome P450 and phase II enzyme systems in rat precision-cut rat lung slices by the intact glucosinolates, glucoraphanin and glucoérucine. *Lung Cancer* 2011b;71:298–305.
- Agee AE**, Surpin M, Sohn EJ, Girke T, Rosado A, Kram BW, Carter C, Wentzell AM, Kliebenstein DJ, Jin HC, Park OK, Jin H, Hicks GR, Raikhel NV. Modified vacuole phenotype1 is an *Arabidopsis* myrosinase associated protein involved in endomembrane protein trafficking. *Plant Physiol* 2010;152:120–132.
- Alonso JM**, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 2003;301:653–657.
- Andersson M**, Grankvist K. Ascorbate-induced free radical toxicity to isolated islet cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27:493–498.
- Antoszewski R**, Rangelov B, Dzieciol U, Bachmann S. Influence of gamma radiation on the transport of indolyl-3-acetic acid in bark tissue from apple trees. *Physiol Plant* 1978;44:347–350.
- Azimzadeh J**, Nacry P, Christodoulidou A, Drevensek S, Camilleri C, Amiour N, Parcy F, Pastuglia M, Bouchez D. *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell* 2008;20:2146–2159.
- Baerenfaller K**, Grossmann J, Grobei MA, Hull R, Hirsch-Hoffmann M, Yalovsky S, Zimmermann P, Grossniklaus U, Gruissem W, Baginsky S. Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. *Science* 2008;320:938–941.
- Bagi G**, Bornemisza-Pauspert P, Hidvegi EJ. Inverse correlation between growth and degrading enzyme activity of seedlings after gamma and neutron irradiation of pea seeds. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1988;53:507–519.
- Barillari J**, Cervellati R, Paolini M, Tatibouët A, Rollin P, Iori R. Isolation of 4-methylthio-3-buteny glucosinolate from *Raphanus sativus* sprouts (Kaiware Daikon) and its redox properties. *J Agric Food Chem* 2005a;53:9890–9896.
- Barillari J**, Canistro D, Paolini M, Ferroni F, Pedulli GF, Iori R, Valgimigli J. Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. *J Agric Food Chem* 2005b;53:2475–2482.
- Bednarek P**, Pislewska-Bednarek M, Svatos A, Schneider B, Doubsky J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, Molina A, Schulze-Lefert P. A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 2009;323(5910):101–106.

- Benjamini Y**, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 1995;57:289–300.
- Bianchi A**, G. Marchesi G, Soressi GP. Some results in radiogenetical experiments with tomato varieties. *Radiat Bot* 1963;3(4):333–343.
- Bodnaryk RP**. Effects of wounding on the glucosinolates in the cotyledons of oilseed rape and mustard. *Phytochem* 1992;31:2671–2677.
- Bodnaryk RP**. Potent effect of jasmonates on indole glucosinolates in oilseed rape and mustard. *Phytochem* 1994;35:301–305.
- Bollenbach TJ**, Sharwood RE, Gutierrez R, Mache SL, Stern DB. The RNA-binding proteins CSP41a and CSP 41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 2009;69:541–52.
- Bones AM**, Rossiter JT. The enzymatic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochem* 2006;67:1053–1067.
- Boyes DC**, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 2001;13:1499–1510.
- Brader G**, Tas E, Tapio Palva E. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the non-specific pathogen *Erwinia carotova*. *Plant Physiol* 2001;126:849–860.
- Brader G**, Mikkelsen MD, Halkier BA, Tapio Palva E. Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants. *Plant J* 2006; 46:758–767.
- Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
- Brand-Williams W**, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technol* 1995;28:25–30.
- Brown PD**, Tokuhiya JG, Reichelt M, Gershenson J. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 2003;62:471–481.
- Brunelli D**, Tavecchio M, Falcioni C, Frapolli R, Erba E, Iori R, Rollin P, Barillari J, Manzotti C, Morazzoni P, D’Incalci M. The isothiocyanate produced from glucomoringin inhibits NF- $\kappa$ B and reduces myeloma growth in nude mice *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 2010;79:1141–1148.
- Burmeister WP**, Cottaz S, Driguez H, Iori R, Palmieri S, Henrissat B. The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* 1997;5:663–675.
- Burow M**, Losansky A, Müller R, Plock A, Kliebenstein DJ, Wittstock U. The genetic basis of constitutive and herbivore-induced ESP-independent nitrile formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2009;149:561–574.
- Cabello-Hurtado F**, Gicquel M, Esnault M-A. Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective. *Food Chem* 2012;132:1003–1009.



- Calabrese EJ.** Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environ Pollut* 2005;138(3):379–411.
- Calmes B.** Réponses adaptatives d'*Alternaria Brassicicola* au stress oxydatif lors de l'interaction avec les Brassicaceae. Rôle du métabolisme du mannitol et des glutathion-S-transférases. Thèse de Doctorat de l'Université d'Angers soutenue le 18 juillet 2011.
- Candiano G,** Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004;25:1327–1333.
- Carballo JA,** Pincheira J, De la Torre C. The G2 checkpoint activated by DNA damage does not prevent genome instability in plant cells. *Biol Res* 2006;39:331–340.
- Cartea ME,** Velasco P. Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews* 2008;7:213–229.
- Celenza JL,** Quiel JA, Smolen GA, Merrikk H, Silvestro AR, Normanly J, Bender J. The Arabidopsis ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiol* 2005;137:253–262.
- Chen S,** Glawischnig E, Jorgensen K, Naur P, Jorgensen B, Olse CE, Hansen C, Rasmussen H, Pickett JA, Halkier BA. CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant J* 2003;33:923–937.
- Chen K-M,** Holmstrom M, Raksajit W, Suorsa M, Piippo M, Aro E-M. Small chloroplast-targeted DnaJ proteins are involved in optimization of photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 2010;10:43–58.
- Chenal C,** Legue F, Nourgalieva K, Brouazin-Jousseume V, Durel S, Guitton N. Exposition of human to low doses and low dose rate irradiation: an urgent need for new markers and new models. *Radiat Biol Radioecol* 2000;40:627–629.
- Chittezhath M,** Kuttan G. Radioprotective activity of naturally occurring organosulfur compounds. *Tumori* 2006;92:163–169.
- Cho HS,** Lee HS, Pai H-S. Expression of diverse genes in response to gamma irradiation in *Nicotiana tabacum*. *J Plant Biol* 2000;43:82–87.
- Chung BY,** lee YB, Baek MH, Kim JH, Wi JH, Kim JS. Effects of low-dose gamma-irradiation on production of shikonin derivatives in callus culture of *Lithospermum erythrorhizon*. *S Rad Phys Chem* 2006;75:1018–1023.
- Clay NK,** Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM. Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* 2009;323(5910):95–101.
- Clossais N,** Larher F. Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle. *J Sci Food Agric* 1991;56:25–38.
- Cork JM,** Purugganan MD. High-Diversity Genes in the Arabidopsis Genome. *Genetics* 2005;170:1897–1911.
- Cools T,** De Veyler L. DNA stress checkpoint control and plant development. *Curr Opin Plant Biol* 2009;12:23–28.
- Culligan KM,** Robertson CE, Foreman J, Doerner P, Britt AB. ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionising radiation. *The Plant J* 2006;48:947-961.

- Cumming G**, Fidler F, Vaux DL. Errors bars in experimental biology. *J Cell Biol* 2007;177:7–11.
- Danchenko M**, Skultety L, Rashydov NM, Berezhna VV, Matel L, Salaj T, Pret'ova A, Hajduch M. Proteomic analysis of mature soybean seeds from the Chernobyl area suggests plant adaptation to the contaminated environment. *J Proteome Res* 2009;8:2915–22.
- Dauvergne X**, Cérantola S, Salaün S, Magné C, Kervarec N, Bessières MA Deslandes E. General occurrence of the glucosinolate glucocochlearin within the *Cochlearia* genus. *Carbohydr Res* 2006;341:2166–2169.
- De Micco V**, Arena C, Pignalosa D, Durante M. Effects of sparsely and densely ionising radiation on plants. *Radiat Environ Biophys* 2011;50:1–19.
- Deng XS**, Tuo JS, Poulsen HE, Loft S. Prevention of oxidative DNA damage in rats by Brussels sprouts. *Free Radic Res* 1998;28:323–333.
- De Schutter K**, Joubès J, Cools T, Verkest A, Corellou F, Bablychuk E, Van Der Schueren E, Beeckman T, Kushnir S, Inzé D, De Veylder L. Arabidopsis WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell* 2007;19:211–225.
- Deveaux Y**, Alonso B, Pierrugues O, Godon C, Kazmaier M. Molecular cloning and developmental expression of AtGR1, a new growth-related Arabidopsis gene strongly induced by ionizing radiation. *Radiat Res* 2000;154:355–364.
- De Vos M**, Kriksunov KL, Jander G. Indole-3-acetonitrile production from indole glucosinolates deters oviposition by *Pieris rapae*. *Plant Physiol* 2008;146:916–926.
- Ding Y-H, Liu N-Y, Tang Z-S, Liu J, Yanga W-C**. Arabidopsis GLUTAMINE-RICH PROTEIN23 is essential for early embryogenesis and encodes a novel nuclear PPR motif protein that interacts with RNA Polymerase II Subunit III. *Plant Cell* 2006;18:815–830.
- Dini I**, Tenore GC, Dini A. Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of *Allium caepa* L. var. *tropeana* (red onion) seeds. *Food Chem* 2008;107:613–621.
- Dixit AK**, Bhatnagar D, Kumar V, Rani A, Manjaya JG, Bhatnagar D. Gamma irradiation induced enhancement in isoflavones, total phenol, anthocyanin and antioxidant properties of varying seed coat colored soybean. *J Agric Food Chem* 2010;58:4298–4302.
- Dixon DP**, Edwards R. Glutathione transferases. *The Arabidopsis book* 2010;8:e0131.
- Doughty KJ**, Porter AJR, Morton AM, Kiddle G, Bock CH, Wallsgrove R. Variation in the glucosinolates content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. II. Response to infection by *Alternaria brassicae* (Berk). *Sacc Ann Appl Biol* 1991;118:469–477.
- Doutriaux MP**, Couteau F, Bergounioux C, White C. Isolation and characterisation of the RAD51 and DMC1 homologs from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 1998;257:283–291.
- Duan H**, Huang MY, Palacio K, Schuler MA. Variations in CYP74B2 (hydroperoxide lyase) gene expression differentially affect hexenal signaling in the Columbia and Landsberg *erecta* Ecotypes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2005;139:1529–1544.
- Eilert U**, Wolters B, Nahrstedt A. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. *Planta Med* 1981;42:55–61.

- Encina CL**, Constantin M, Botella J. An easy and reliable method for establishment and maintenance of leaf and root cell cultures of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol Report* 2001;19:245–248.
- Esnault MA**, Legué F, Chenal C. Ionizing radiation: advances in plant response. *Environm Exp Bot* 2010;68:231–237.
- Fahey JW**, Talalay P. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol* 1999;37:973–979.
- Fahey JW**, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochem* 2001;56:5–51.
- Falk KL**, Tokuhisa JG, Gershenzon J. The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biol (Stuttg)* 2007;9:573–581.
- Falovo C**, Schreiner M, Schwarz D, Colla G, Krumbein A. Phytochemical changes induced by different nitrogen supply forms and radiation levels in two leafy Brassica species. *J Agric Food Chem* 2011;59(8):4198–4207.
- Fan X**, Thayer DW. Quality of irradiated Alfalfa sprouts. *J Food Prot* 2001;64:1574–1578.
- Fimognari C**, Nüsse M, Iori R, Cantelli-Forti G, Hrelia P. The new isothiocyanate 4-(methylthio)butylisothiocyanate selectivity affects cell-cycle progression and apoptosis induction of human leukemia cells. *Invest New Drugs* 2004;22:119–129.
- Gagnot S**, Tamby J-P, Martin-Magniette M-L, Bitton F, Taconnat L, Balzergue S, Aubourg S, Renou J-P, Lechamy A, Brunaud V. CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. *Nucleic Acids Res* 2008;36:D986–990.
- Geraskin SA**, Dikarev VG, Zyablitska YY, Oudalova AA, Spirin YV, Alexakhin RM. Genetic consequences of radioactive contamination by the Chernobyl fallout to agricultural crops. *J Env Radioactivity*. 2003;66:155–169.
- Giamoustaris A**, Mithen R. The effect of modifying the glucosinolates content of oilseed rape (*Brassica napus ssp oleifera*) on its interaction with specialist and generalist pests. *Ann Appl Biol* 1995;126:347–363.
- Giannopolitis CN**, Ries SK. Superoxide Dismutases, I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 1977;59:309–314.
- Giavalisco P**, Nordhoff E, Lehrach H, Gobom J, Klose J. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. *Electrophoresis* 2003;24(1-2):207–216.
- Gicquel M**, Esnault MA, Jorrín-Novo JV, Cabello-Hurtado F. Application of proteomics to the assessment of the response to ionising radiation in *Arabidopsis thaliana*. *J Proteomics* 2011;74(8):1364–1377.
- Gigolashvili T**, Berger B, Mock HP, Müller C, Weisshaar B, Flügge UI. The transcription factor HIG/MYB51 regulates indolic glucosinolates biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2007;50:886–901.
- Gigolashvili T**, Yatusovich R, Rollwitz I, Humphry M, Gershenzon J, Flügge UI. The plastidic bile acid transporter 5 is required for the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2009;21:1813–1829.

- Gygi SP**, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19:1720–1730.
- Goodhead DT**, Nikjoo H. Track structure analysis of ultrasoft X-rays compared to high- and low-LET radiations. *Int J Radiat Biol* 1989;55:513–529.
- Gordon SA**, Gaur BK, Woodstock L. Correlative inhibition of root emergence in the gamma-irradiated *Coleus* leaf. I. Premorphogenic levels of auxin, RNA and metabolites in the petiole base. *Rad Bot* 1971;11:453–461.
- Grossman HH**, Craig R. The effect of gamma irradiation of seeds on germination and plant morphology of *Pelargonium X hortorum*. *J. amer Soc Hort Sci* 1982 ;107:72–75.
- Grubb CD**, Zipp BJ, Ludwig-Müller J, Masuno MN, Molinski TF, Abel S. *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant J* 2004;40:893–908.
- Grubb CD**, Abel S. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci* 2006;11(2):89–100.
- Gupta ML**, Gupta V, Shukla SK, Verma S, Sankhwar S, Dutta A, Suri KA. Inhibition in radiation mediated cellular toxicity by minimizing free radical flux: one of the possible mechanisms of biological protection against lethal ionizing radiation by a sub-fraction of *Podophyllum hexandrum*. *Cell Mol Biol* 2010;56 Suppl:OL1341-9.
- Hara M**, Yatsuzuka Y, Tabata K, Kuboi T. Exogenously applied isothiocyanates enhance glutathione S-transferase expression in *Arabidopsis* but act as herbicides at higher concentrations. *J Plant Physiol* 2010;167:643–649.
- Hayes JD**, Kelleher MO, Eggleston IM. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur J Nutr* 2008;47(S):73–88.
- Hefner E**, Huefner N, Britt A.B. Tissue-specific regulation of cell-cycle responses to DNA damage in *Arabidopsis* seedlings. *DNA Repair* 2006;1:102–110.
- Hilson P**, Allemeersch J, Altmann T, Aubourg S, Avon A, Beynon J, Bhalerao RP, Bitton F, Caboche M, Cannoot B, Chardakov V, Cognet-Holliger C, Colot V, Crowe M, Darimont C, Durinck S, Eickhoff H, de Longevialle AF, Farmer EE, Grant M, Kuiper MT, Lehrach H, Léon C, Leyva A, Lundeborg J, Lurin C, Moreau Y, Nietfeld W, Paz-Ares J, Reymond P, Rouzé P, Sandberg G, Segura MD, Serizet C, Tabrett A, Taconnat L, Thareau V, Van Hummelen P, Vercruyse S, Vuylsteke M, Weingartner M, Weisbeek PJ, Wirta V, Wittink FR, Zabeau M, Small I. Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Res* 2004;14(10B):2176–2189.
- Hirai MY**, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuhara M, Arita M, Fujiwara T, Saito K. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10205–10210.
- Hirai MY**, Sugiyama K, Sawada Y, Tohge T, Obayashi T, Suzuki A, Araki R, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, Goda H, Nishizawa OI, Shibata D, Saito K. Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolates biosynthesis. *PNAS* 2007;104:6478–6483.
- Hirai MY**. A robust omics-based approach for the identification of glucosinolate biosynthetic genes. *Phytochem Rev* 2009;8:15–23.

- Hiruma K**, Onozawa-Komori M, Takahashi F, Asakura M, Bednarek P, Okuno T, Schulze-Lefert P, Takano Y. Entry mode-dependent function of an indole glucosinolate pathway in *Arabidopsis* for nonhost resistance against anthracnose pathogens. *Plant Cell* 2010;22:2429–2443.
- Holst B**, Williamson G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat Prod Rep* 2004;21:425–447.
- Hung CD**, Johnson K. Effects of ionising radiation on the growth and allyl isothiocyanate accumulation of *Wasabia japonica* in vitro and ex vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2008;44:51–58.
- Hull AK**, Vij R, Celenza JL. *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2379–2384.
- IAEA**. Diagnosis and treatment of radiation injuries. Safety Reports Series 1998; n°2.
- IARC**. Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates and Indole. Handbooks of Cancer Prevention 2004; n°9.
- Ismail MS**, Amer AS, Wahba O, Shalby H, Arian F. Effect of antioxidants on markers of apoptosis in postoperative radiotherapy of cancer cervix. *Gulf J Oncolo* 2010;(7):8–13.
- Jambunathan N**, Penaganti A, Tang Y, Mahalingam R. Modulation of redox homeostasis under suboptimal conditions by *Arabidopsis* nudix hydrolase 7. *BMC Plant Biol* 2010;10:173–188.
- James DC**, Rossiter JT. Development and characteristics of myrosinase in *Brassica napus* during early seedling growth. *Physiol Plant* 1991;82:163–170.
- Jeong WS**, Kim IW, Hu R, Kong ANT. Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Pharmaceutical Research* 2004;21:661–670.
- Jones HE**, West HM, Chamberlain PM, Parekh NR, Beresford NA, Crout NM. Effects of gamma irradiation on *Holcus lanatus* (Yorkshire fog grass) and associated soil microorganisms. *J Environ Radioact* 2004;74:57–71.
- Kal'chenko VA**, Fedotov IS. Genetic effects of acute and chronic ionizing irradiation on *Pinus sylvestris* L. inhabiting the Chernobyl Meltdown area. *Russian J Genetics* 2001;37:341–350.
- Kamali AR**, E. C. Maxie EC, Rae HL. Effect of Gamma Irradiation on 'Fuerte' Avocado Fruits. *HortSci* 1972;4(2):125–126.
- Keum YS**, Jeong WS, Kong ANT. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat Res* 2004;555:191–202.
- Kiddle GA**, Doughty KJ, Wallsgrove RM. Salicylic acid-induced accumulation of glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*) leaves. *J Exp Bot* 1994;45:1343–1346.
- Kiddle G**, Bennett RN, Botting NP, Davidson NE, Robertson AAB, Wallsgrove RM. High-performance liquid chromatographic separation of natural and synthetic desulphoglucosinolates and their chemical validation by UV, NMR, and chemical ionisation–MS methods. *Phytochem Anal* 2001;12:226–242.

- Kim SJ**, Matsuo T, Watannabe M, Watannabe Y. Effect of nitrogen and sulfur application on the glucosinolate concentration in vegetable turnip rape (*Brassica rapa* L.). *Soil Sci Plant Nutr* 2002;48:43-49.
- Kim J-H**, Chung BY, Kim J-S, Wi SG. Effects of *in planta* gamma-irradiation on growth, photosynthesis, and antioxidative capacity of red pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *J Plant Biol* 2005a;48:47-56.
- Kim YS**, Milner JA. Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *J Nutr Biochem* 2005b;16:65-73.
- Kim J-H**, Moon YR, Kim J-S, Oh MH, Lee J-W, Chung BY. Transcriptomic profile of *Arabidopsis* rosette leaves during the reproductive stage after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 2007;168:267-280.
- Kim DS**, Kim J-B, Goh EJ, Kim W-J, Kim SH, Seo YW, Jang CS, Kang S-Y. Antioxidant response of *Arabidopsis* plants to gamma irradiation: Genome-wide expression profiling of the ROS scavenging and signal transduction pathways. *J Plant Physiol* 2011;168:1960-1971.
- Kliebenstein DJ**, Kroymann J, Brown P, Figuth A, Pedersen D, Gershenzon J, Mitchell-Olds T. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiol* 2001a;126:811-825.
- Kliebenstein DJ**, Gershenzon J, Mitchell-Olds T. Comparative quantitative trait loci mapping of aliphatic, indolic and benzylic glucosinolate production in *Arabidopsis thaliana* leaves and seeds. *Genetics* 2001b;159:359-370.
- Kliebenstein DJ**, Figuth A, Mitchell-Olds T. Genetic architecture of plastic methyl jasmonate responses in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 2002;161:1685-1696.
- Klubicová K**, Danchenko M, Skultety L, Miernyk JA, Rashydov NM, Berezhna VV, Pret'ová A, Hajdúch M. Proteomics analysis of flax grown in Chernobyl area suggests limited effect of contaminated environment on seed proteome. *Environ Sci Technol* 2010;44:6940-6946.
- Knill T**, Schuster J, Reichelt M, Gershenzon J, Binder S. *Arabidopsis* branched-chain aminotransferase 3 functions in both amino acid and glucosinolate biosynthesis. *Plant Physiol* 2008;146:1028-1039.
- Koroleva OA**, Davies A, Deeken R, Michael R, Thorpe MR, A. Deri Tomos AD, Hedrich R. Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk. *Plant Physiol* 2000;124:599-608.
- Kovalchuk O**, Arkhipov A, Barylyak I, Karachov I, Titov V, Hohn B, Kovalchuk I. Plants experiencing chronic internal exposure to ionizing radiation exhibit higher frequency of homologous recombination than acutely irradiated plants. *Mutat Res* 2000;449:47-56.
- Kovalchuk I**, Molinier J, Yao Y, Arkhipov A, Kovalchuk O. Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation. *Mutat Res* 2007;624:101-113.
- Kroymann J**, Donnerhacke S, Schnabelrauch D, Mitchell-Olds T. Evolutionary dynamics of an *Arabidopsis* insect resistance quantitative trait locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100 Suppl 2:14587-14592.
- Kurimoto T**, Constable JV, Huda A. Effects of ionizing radiation exposure on *Arabidopsis thaliana*. *Health Phys* 2010;99:49-57.

- Kushad MM**, Brown AF, Kurilich AC, Juvik JA, Klein BP, Wallig MA, Jeffery EH. Variation in glucosinolates in vegetables crops of Brassica oleracea. *J Agric Food Chem* 1999;47:1541–1548.
- Kwon ST**, Jung E-A, Kim J-S. Effect of g-radiation on growth and antioxidant enzyme activities in Red Pepper. *Korean J. Life Science* 2001;11(6):612–617 (Korean article).
- Lambrix V**, Reichelt M, Mitchell-Olds T, Kliebenstein DJ, Gershenzon J. The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia* herbivory. *The Plant Cell* 2001;13:2793–2807.
- Larrigaudière C**, Latche A, Pech JC, Triantaphylides C. Short-term effects of  $\gamma$ -irradiation on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid metabolism in early climacteric cherry tomatoes. *Plant Physiol* 1990;92:577–581.
- Larrigaudière C**, Latché A, Pech JC, Triantaphylidès C. Relationship between stress ethylene production induced by gamma irradiation and ripening of cherry tomatoes. *J Amer Soc Hort Sci* 1991;116:1000–1003.
- Lazzeri L**, Curti G, Leoni O, Dallavalle E. Effects of glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. *J Agric Food Chem* 2004;52:6703–6707.
- Lee MH**, Moon YR, Chung BY, Kim J-S, Lee K-S, Cho J-Y, Kim J-H. Practical use of chemical probes for reactive oxygen species produced in biological systems by  $\gamma$ -irradiation. *Radiat Phys Chem* 2009;78:323–327.
- Le Lay P**, Isaure M-P, Sarry J-E, Kuhn L, Fayard B, Le Bail J-L, Bastien O, Garin J, Roby C, Bourguignon J. Metabolomic, proteomic and biophysical analyses of *Arabidopsis thaliana* cells exposed to a caesium stress. Influence of potassium supply. *Biochimie* 2006;88:1533–1547.
- Levy M**, Qiaomei Wang Q, Roy Kaspi R, Michael P, Parrella MP, Abel S. Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant Journal* 2005;43:79–96.
- Li J**, Hansen BG, Ober JA, Kliebenstein DJ, Halkier BA. Subclade of flavin-monooxygenases involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Plant Physiol* 2008;148:1721–1733.
- Lichtenthaler HK**, Wellburn RR. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 1983;603:591–592.
- Lin SS**, Martin R, Mongrand S, Vandenabeele S, Chen KC, Jang IC, Chua NH. RING1 E3 ligase localizes to plasma membrane lipid rafts to trigger FB1-induced programmed cell death in Arabidopsis. *Plant J* 2008;56:550–561.
- Liu J**, Zhang Y, Qin G, Tsuge T, Sakaguchi N, Luo G, Sun K, Shi D, Aki S, Zheng N, Aoyama T, Oka A, Yang W, Umeda M, Xie Q, Gu H, Qu LJ. Targeted degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK4/KRP6 by RING-type E3 ligases is essential for mitotic cell cycle progression during Arabidopsis gametogenesis. *Plant Cell* 2008;20(6):1538–1554.
- Liu H**, Sadygov RG, Yates JR. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* 2004;76:4193–4201.

- Llorente F**, Alonso-Blanco C, Sanchez-Rodriguez C, Jorda L, Molina A. ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J* 2005;43:165–180.
- Lu Y**, Hall DA, Last RL. A small zinc finger thylakoid protein plays a role in maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2011;23:1861–1875.
- Lurin C**, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Tacconnat L, Small I. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 2004;16:2089–2103.
- Machaiah JP**, Vakil UK, Sreenivasan A. The effect of gamma irradiation on biosynthesis of gibberellins in germinating wheat. *Environ Exp Bot* 1976;16:131–134.
- Maity JP**, Mishra D, Chakraborty A, Saha A, Santra SC, Chanda S. Modulation of some quantitative and qualitative characteristics in rice (*Oryza sativa* L.) and mung (*Phaseolus mungo* L.) by ionizing radiation. *Radiat Phys Chem* 2005;74(5):391–394.
- Maldonado AM**, Echevarria-Zomeño S, Jean-Baptiste S, Hernandez M, Jorin-Novo JV. Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *J Proteomics* 2008;71:461–472.
- Martin BD**, Schoenhard JA, Hwang JM, Sugden KD. Ascorbate is a pro-oxidant in chromium-treated related human lung cells. *Mutat Res* 2006;610:74–84.
- Masle J**, Scott R, Gilmore SR, Farquhar GD. The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*. *Nature* 2005;436:866–870.
- Matsushima R**, Fukao Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I. NAI1 gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *Plant Cell* 2004;16:1536–1549.
- Mewis I**, Tokuhsa JG, Schultz JC, Appel HM, Ulrichs C, Gershenzon J. Gene expression and glucosinolate accumulation in *Arabidopsis thaliana* in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathway. *Phytochem* 2006;67:2450–2462.
- Michel V**, Ahmed H, Dutheil A. La biofumigation, une méthode de lutte contre les maladies du sol. *Revue suisse Vitic Arboric Horti* 2007;39:145–150.
- Mikkelsen MD**, Hansen CH, Wittstock U, Halkier BA. Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J Biol Chem* 2000;275:33712–33717.
- Mikkelsen MD**, Petersen BL, Glawischnig E, Jensen AB, Andreasson E, Halkier BA. Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. *Plant Physiol* 2003; 131:298–308.
- Mikkelsen MD**, Naur P, Halkier BA. *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolates biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant J* 2004;37:770–777.
- Mikkelsen MD**, Olsen CE, Halkier BA. Production of the cancer-preventive glucoraphanin in tobacco. *Mol Plant* 2010;3(4):751–759.
- Miura K**, Hashimoto T, Yamaguchi H. Effect of g-irradiation on cell elongation and auxin level in *Avena* coleoptiles. *Radiat Bot* 1974;14:207–215.



- Momiyama M**, Koshiha T, Furukawa K, Kamiya Y, Satô M. Effects of g-irradiation on elongation and indole-3-acetic acid level of maize (*Zea mays*) coleoptiles. *Env Exp Bot* 1999;41:131–143.
- Moy KA**, Yuan JM, Chung FL, Van Den Berg D, Wang R, Gao YT, Yu MC. Urinary total isothiocyanate and colorectal cancer: a prospective study of men in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(6):1354–1359.
- Müller C**, Wittstock U. Uptake and turn-over of glucosinolates sequestered in the sawfly *Athalia rosae*. *Insect Biochem Mol Biol* 2005;(10):1189–1198.
- Mullineaux PM**, Baker NR. Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death?. *Plant Physiol* 2010;154:521–525.
- Mumm R**, Burow M, Bukovinszky Kiss G, Kazantzidou E, Wittstock U, Dicke M, Gershenzon J. Formation of simple nitriles upon glucosinolate hydrolysis affects direct and indirect defense against the specialist herbivore, *Pieris rapae*. *J Chem Ecol* 2008;34:1311–1321.
- Musk RR**, Smith TK, Johnson IT. On the cytotoxicity and genotoxicity of allyl and phenethyl isothiocyanates and their parent glucosinolates sinigrin and gluconasturtiin. *Mutat Res* 1995;348:19–23.
- Nafisi M**, Sønderby IE, Hansen BG, Geu-Flores F, Nour-Eldin HH, Nørholm MHH, Jensen NB, Li J, Halkier BA. Cytochromes P450 in the biosynthesis of glucosinolates and indole alkaloids. *Phytochem Rev* 2006;5:331–346.
- Nagano AJ**, Ryo Matsushima R, Hara-Nishimura I. Activation of an ER-body-localized  $\beta$ -glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2005;46: 1140–1148.
- Nagano AJ**, Fukao Y, Fujiwara M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type  $\beta$ -glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2008;49:969–980.
- Nagata AJ**, Todoriki S, Masumizu T, Suda I, Furuta S, Du Z, Kikuchi S. Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in *Arabidopsis*. *J Agric Food Chem* 2003;51:1992–2999.
- Nagata T**, Yamada H, Du Z, Todoriki S, Kikuchi S. Microarray analysis of genes that respond to  $\gamma$ -irradiation in *Arabidopsis*. *J Agric Food Chem* 2005;53:1022–1030.
- Nastruzzi C**, Cortesi R, Esposito E, Menegatti E, Leoni O, Iori R, Palmieri S. In vitro cytotoxic activity of some glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *J Agric Food Chem* 1996;44:1014– 1021.
- Naur P**, Petersen BL, Mikkelsen MD, Bak S, Rasmussen H, Olsen CE, Halkier BA. CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003;133:63–72.
- Noret N**, Meerts P, Vanhaelen M, Dos Santos A, Escarré J. Do metal-rich plants deter herbivores? A field test of the defence hypothesis. *Oecologia*. 2007;152:92–100.
- Olejnik K**, Bucholc M, Anielska-Mazur A, Lipko A, Kujawa M, Modzelan M, Augustyn A, Kraszewska E. *Arabidopsis thaliana* Nudix hydrolase AtNUDT7 forms complexes with the regulatory RACK1A protein and gamma subunits of the signal transducing heterotrimeric G protein. *Acta Biochim Pol* 2011;58:609–616.

- Olivarez-Hernandez R**, Bordel S, Nielsen J. Codon usage variability determines the correlation between proteome and transcriptome fold change. *BMC Syst Biol* 2011;5:33–41.
- Omirou M**, Rousidou C, Bekris F, Papadopoulou KK, Menkissoglou-Spiroudi U, Ehaliotis C, Karpouzas DG. The impact of biofumigation and chemical fumigation methods on the structure and function of the soil microbial community. *Microb Ecol* 2011;61:201–213.
- Osakabe K**, Abe K, Yoshioka T, Osakabe Y, Todoriki S, Ichikawa H, Hohn H, Toki S. Isolation and characterization of the RAD54 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2006;48:827–842.
- Ou B**, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001;49:4619–4626.
- Papi A**, Orlandi M, Bartolini G, Barillari J, Iori R, Paolini M, Ferroni F, Fumo MG, Pedulli GF, Valgimigli L. Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (Kaiware Daikon) sprouts. *J Agric Food Chem* 2008;56:875–883.
- Pellegrini CN**, Crocib CA, Orioli GA. Morphological changes induced by different doses of gamma irradiation in garlic sprouts. *Radiat Phys Chem* 57;2000:315–318.
- Pendharka MB**, Nair PM. Induction of phenylalanine ammonia lyase (PAL) in gamma irradiated potatoes. *Radiat Bot* 1975;15:191–197.
- Petersen BL**, Chen S, Hansen CH, Olsen CE, Halkier BA. Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 2001;214:562–571.
- Petrak J**, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, Zivny J, Vulpe CD. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 2008;8:1744–1749.
- Pfalz M**, Vogel H, Kroymann J. The gene controlling the indole glucosinolate modifier1 quantitative trait locus alters indole glucosinolate structures and aphid resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009;21:985–999.
- Pfalz M**, Mikkelsen MD, Bednarek P, Olsen CE, Halkier BA, Kroymann J. Metabolic engineering in *Nicotiana benthamiana* reveals key enzyme functions in *Arabidopsis* indole glucosinolate modification. *Plant Cell* 2011;23(2):716–29.
- Piotrowski M**, Schemenewitz A, Lopukhina A, Muller A, Janowitz T, Weiler EW, Oecking C. Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure. *J Biol Chem* 2004;279:50717–50725.
- Podsędek A**. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. *LWT Food Sci Technol* 2007;40:1–11.
- Preuss SB**, Britt A.B. A DNA-damage-induced cell cycle checkpoint in *Arabidopsis*. *Genetics* 2003;164:323–334.
- Prior RL**, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005;53:4290–4302.
- Puskas LG**, Zvara A, Hackler L Jr, Van Hummelen P. RNA amplification results in reproducible microarray data with slight ratio bias. *Biotechniques* 2002;32:1330–1340.

- Rakwal R**, Agrawal GK, Shibato J, Imanaka T, Fukutani S, Tamogami S, Endo S, Sahoo SK, Masuo Y, Kimura S. Ultra Low-Dose Radiation: Stress Responses and Impacts Using Rice as a Grass Model. *Int J Mol Sci* 2009;10:1215–1225.
- Rask L**, Andréasson E, Ekbom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* 2000;42:93–113.
- Re R**, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231–1237.
- Renwick JA**, Haribal M, Gouinguéné S, Städler E. Isothiocyanates stimulating oviposition by the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J Chem Ecol* 2006;32:755–66.
- Ricaud L**, Proux C, Renou J-P, Pichon O, Fochesato S, Ortet P, Montané M-H. ATM-mediated transcriptional and developmental responses to gamma-rays in Arabidopsis. *PLoS ONE* 2007;2:e430.
- Riov J**, Monselise SP, Kahan RS. Radiation damage to grapefruit in relation to ethylene production and phenylalanine ammonia lyase activity. *Radiat Bot* 1970;10:281–286.
- Rodman JE**, Soltis PS, Soltis DE, Sytsma KJ, Karol KG. Parallel evolution of glucosinolates biosynthesis inferred from congruent nuclear and plastid gene phylogenies. *Am J Bot* 1998;85:997–1006.
- Roessingh P**, Städler E, Fenwick GR, Lewis JA, Nielsen JK, Hurter J, Ramp T. Oviposition and tarsal chemoreceptors of the cabbage root fly are stimulated by glucosinolates and host plant extracts. *Entomol Exp Appl* 1994;65:267–282.
- Ronse de Craene LP**, Haston E. The systematics relationships of glucosinolate-producing plants and related families : a cladistic investigation based on morphological and molecular characters. *Bot J Linnean Soc* 2006;151:453–494.
- Sakamoto A**, Lan VTT, Hase Y, Shikazono N, Matsunaga T, Tanaka A. Disruption of the AtREV3 gene causes hypersensitivity to ultraviolet B light and gamma-rays in Arabidopsis: implication of the presence of a translesion synthesis mechanism in plants. *Plant Cell* 2003;15:2042–2057.
- Salanoubat M**, Lemcke K, Rieger M, Ansoerge W, Unseld M, Fartmann B, Valle G, Blöcker H, Perez-Alonso M, Obermaier B, Delseny M, Boutry M, Grivell LA, Mache R, Puigdomènech P, De Simone V, Choisine N, Artiguenave F, Robert C, Brottier P, Wincker P, Cattolico L, Weissenbach J, Saurin W, Quétier F, Schäfer M, Müller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Benes V, Wurmbach E, Drzonek H, Erfle H, Jordan N, Bangert S, Wiedelmann R, Kranz H, Voss H, Holland R, Brandt P, Nyakatura G, Vezzi A, D'Angelo M, Pallavicini A, Toppo S, Simionati B, Conrad A, Hornischer K, Kauer G, Löhnert TH, Nordsiek G, Reichelt J, Scharfe M, Schön O, Barges M, Terol J, Climent J, Navarro P, Collado C, Perez-Perez A, Ottenwälder B, Duchemin D, Cooke R, Laudie M, Berger-Llauro C, Purnelle B, Masuy D, de Haan M, Maarse AC, Alcaraz JP, Cottet A, Casacuberta E, Monfort A, Argiriou A, flores M, Liguori R, Vitale D, Mannhaupt G, Haase D, Schoof H, Rudd S, Zaccaria P, Mewes HW, Mayer KF, Kaul S, Town CD, Koo HL, Tallon LJ, Jenkins J, Rooney T, Rizzo M, Walts A, Utterback T, Fujii CY, Shea TP, Creasy TH, Haas B, Maiti R, Wu D, Peterson J, Van Aken S, Pai G, Militscher J, Sellers P, Gill JE, Feldblyum TV, Preuss D, Lin X, Nierman WC, Salzberg SL, White O, Venter JC, Fraser CM, Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Kato T, Asamizu E, Sasamoto S, Kimura T, Idesawa K, Kawashima K, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Muraki A, Nakayama S, Nakazaki N, Shinpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M,

- Yasuda M, Tabata S; European Union Chromosome 3 Arabidopsis Sequencing Consortium; Institute for Genomic Research; Kazusa DNA Research Institute. Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000;408:820–822.
- Saloua KS**, Salah K, Nasreddine B, Samia A, Mouldi S, Ahmed L. Sterilization and protection of protein in combinations of *Camellia sinensis* green tea extract and gamma irradiation. *Int J Biol Macromol* 2011;48:452–458.
- Sarkar FH**, Li Y. Indole-3-carbinol and prostate cancer. *J Nutr* 2004;134(12 Suppl):3493S–3498S.
- Schonhof I**, Kläring HP, Krumbein A, Schreiner M. Interaction between atmospheric CO<sub>2</sub> and glucosinolates in broccoli. *J Chem Ecol* 2007;33:105–114.
- Schuster J**, Knill T, Reichelt M, Gershenzon J, Binder S. Branched-chain aminotransferase4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006;18:2664–2679.
- Sepúlveda-Jiménez G**, Rueda-Benitez P, Porta H, Rocha-Sosa M. A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress. *J Exp Bot* 2005;56:605–611.
- Sharma VP**, Singh HP, Kohli RK, Batish DR. Mobile phone radiation inhibits *Vigna radiata* (mung bean) root growth by inducing oxidative stress. *Sci Total Environ* 2009;407:5543–5547.
- Schnug E**, Sulphur nutrition and quality of of vegetables. *Sulphur Agric* 1990;14:3–7.
- Singh NP**. Sodium ascorbate induces DNA single-strand breaks in human cells in vitro. *Mut Res* 1997;375:195–203.
- Singh SV**, Herman-Antosiewicz A, Singh AV, Lew KL, Srivastava SK, Kamath R, Brown KD, Zhang L, Baskaran R. Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *J Biol Chem* 2004;279:25813–25822.
- Skirycz A**, Reichelt M, Burow M, Birkemeyer C, Rolcik J, Kopka J, Zanol MI, Gershenzon J, Strnad M, Szopa J, Mueller-Roeber B, Witt I. DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 2006;47:10–24.
- Sønderby IE**, Geu-Flores F, Halkier BA. Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci* 2010a;15:283–290.
- Sønderby IE**, Burow M, Rowe HC, Kliebenstein DJ, Halkier BA. A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2010b;153:348–363.
- Sørensen H**. Glucosinolates: structure, properties, function. *Canola and Rapeseed*. Ed. Shadidi F, New York. Collection AVI Book; 1990, p. 149–172.
- Song JH**, Shin SH, Ross GM. Oxidative stress induced by ascorbate causes neuronal damage in an in vitro system. *Brain Res* 2001;895:66–72.
- Spothem-Maurizot M**, Davidková M. Radiation damage to DNA in DNA-protein complexes. *Mutat Res* 2011;711:41–48.

- Srivastava OP**, van Huystee RB. IAA oxidase and polyphenol oxidase activities of peanut peroxidase isoenzymes. *Phytochem* 1977;16:1527–1530.
- Sturn A**, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 2002;18:207–208.
- Tabata S**, Kaneko T, Nakamura Y, Kotani H, Kato T, Asamizu E, Miyajima N, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Muraki A, Nakayama S, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shinpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Sato S, de la Bastide M, Huang E, Spiegel L, Gnoj L, O'Shaughnessy A, Preston R, Habermann K, Murray J, Johnson D, Rohlffing T, Nelson J, Stoneking T, Pepin K, Spieth J, Sekhon M, Armstrong J, Becker M, Belter E, Cordum H, Cordes M, Courtney L, Courtney W, Dante M, Du H, Edwards J, Fryman J, Haakensen B, Lamar E, Latreille P, Leonard S, Meyer R, Mulvaney E, Ozersky P, Riley A, Strowmatt C, Wagner-McPherson C, Wollam A, Yoakum M, Bell M, Dedhia N, Parnell L, Shah R, Rodriguez M, See LH, Vil D, Baker J, Kirchoff K, Toth K, King L, Bahret A, Miller B, Marra M, Martienssen R, McCombie WR, Wilson RK, Murphy G, Bancroft I, Volckaert G, Wambutt R, Dusterhöft A, Stiekema W, Pohl T, Entian KD, Terryn N, Hartley N, Bent E, Johnson S, Langham SA, McCullagh B, Robben J, Grymonprez B, Zimmermann W, Ramsperger U, Wedler H, Balke K, Wedler E, Peters S, van Staveren M, Dirkse W, Mooijman P, Lankhorst RK, Weitzenegger T, Bothe G, Rose M, Hauf J, Berneiser S, Hempel S, Feldpausch M, Lamberth S, Villarroel R, Gielen J, Ardiles W, Bents O, Lemcke K, Kolesov G, Mayer K, Rudd S, Schoof H, Schueller C, Zaccaria P, Mewes HW, Bevan M, Fransz P; Kazusa DNA Research Institute; Cold Spring Harbor and Washington University in St Louis Sequencing Consortium; European Union Arabidopsis Genome Sequencing Consortium. Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000;408:823–828.
- Tai C**, Gu X, Zou H, Guo Q. A new simple and sensitive fluorometric method for the determination of hydroxyl radical and its application. *Talanta* 2002;58:661–667.
- Takechi K**, Sakamoto W, Utsugi S, Murata M, Motoyoshi F. Characterization of a flower-specific gene encoding a putative myrosinase binding protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 1999;40:1287–1296.
- Tamura K**, Fukao Y, Iwamoto M, Haraguchi T, Hara-Nishimuraa I. Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2010;22:4084–4097.
- Tanaka A**, Shikazono N, Hase Y. Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation Rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. *J Radiat Res* 2010;51:223–233.
- Taylor NL**, Tan YF, Jacoby RP, Millar AH. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *J Proteom* 2009;72:367–378.
- Textor S**, Bartram S, Kroymann J, Falk KL, Hick A, Pickett JA, Gershenzon J. Biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* : recombinant expression and characterization of methylthioalkylmalate synthase, the condensing enzyme of the chain-elongation cycle. *Planta* 2004; 218:1026–1035.
- Textor S**, De Kraker JW, Hause B, Gershenzon J, Tokuhsa JG. MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2007;144:60–71.

- The Arabidopsis Genome Initiative.** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000;408:796–815.
- Thejass P, Kuttan G.** Allyl isothiocyanate (AITC) and phenyl isothiocyanate (PITC) inhibit tumour-specific angiogenesis by downregulating nitric oxide (NO) and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production. *Nitric Oxide* 2007;16:247–257.
- Theologis A, Ecker JR, Palm CJ, Federspiel NA, Kaul S, White O, Alonso J, Altfati H, Araujo R, Bowman CL, Brooks SY, Buehler E, Chan A, Chao Q, Chen H, Cheuk RF, Chin CW, Chung MK, Conn L, Conway AB, Conway AR, Creasy TH, Dewar K, Dunn P, Etgu P, Feldblyum TV, Feng J, Fong B, Fujii CY, Gill JE, Goldsmith AD, Haas B, Hansen NF, Hughes B, Huizar L, Hunter JL, Jenkins J, Johnson-Hopson C, Khan S, Khaykin E, Kim CJ, Koo HL, Kremenetskaia I, Kurtz DB, Kwan A, Lam B, Langin-Hooper S, Lee A, Lee JM, Lenz CA, Li JH, Li Y, Lin X, Liu SX, Liu ZA, Luros JS, Maiti R, Marziali A, Militscher J, Miranda M, Nguyen M, Nierman WC, Osborne BI, Pai G, Peterson J, Pham PK, Rizzo M, Rooney T, Rowley D, Sakano H, Salzberg SL, Schwartz JR, Shinn P, Southwick AM, Sun H, Tallon LJ, Tambunga G, Toriumi MJ, Town CD, Utterback T, Van Aken S, Vaysberg M, Vysotskaia VS, Walker M, Wu D, Yu G, Fraser CM, Venter JC, Davis RW.** Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000;408:816–820.
- Tiku AB, Abraham SK, Kale RK.** Protective effect of the cruciferous vegetable mustard leaf (*Brassica campestris*) against in vivo chromosomal damage and oxidative stress induced by  $\gamma$ -radiation and genotoxic chemicals. *Environ Mol Mutagen* 2008;49:335–342.
- Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF, Komeda Y.** The Arabidopsis ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* 1996; 8:735–746.
- Triantaphylidès C, Nespoulous L, Chervin C.** Ammonium requirement for radiation-induced accumulation of polyamines in suspension-cultured grape cells. *Physiol Plant* 1993;87:389–395.
- Trobacher CP.** Ethylene and programmed cell death in plants. *Botany* 2009;87:757–769.
- Tubiana M, Averbeck D, Bourguignon M, Bourthis J, Cassiman J-J, Cosset J-M, Favaudon V, Gardès-Albert M, Girinski T, Gourmelon P, Helfre S, Lartigau E, Masse R, Wambersie A.** RADIOBIOLOGIE : Radiothérapie et radioprotection – bases fondamentales. Ed. Hermann, Paris. Collection Hermann/Médecine; 2008, Chapitre II : Chimie sous rayonnement, p.41–70.
- Ueda H, Nishiyama C, Shimada T, Koumoto Y, Hayashi Y, Kondo M, Takahashi T, Ohtomo I, Nishimura M, Hara-Nishimura I.** AtVAM3 is required for normal specification of idioblasts, myrosin cells. *Plant Cell Physiol* 2006;47:164–175.
- U.S.EPA (United States Environmental Protection Agency),** Ecological effects test guidelines. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101), EPA 712-C-96-154, April 1996.
- Underwood W, Somerville SC.** Focal accumulation of defences at sites of fungal pathogen attack. *J Exp Bot* 2008;59:3501–3508.
- Vackova K, Kutacek M.** Radioresistance of Kohlrabi (*Brassica oleracea* L., var. gongylodes L.) seeds in relation to the Metabolism of indoles, auxins and gibberellins. *Biol Plantarum (Praha)* 1976;18:31–35.

- Valentão P**, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Antioxidant activity in *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *J Agric Food Chem* 2001;49:3476–3479.
- Valgimigli L**, Iori R. Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. *Environ Mol Mutagen* 2009;50:222–237.
- Vanacker H**, Carver TLW, Foyer CH. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol* 1998;117:1103–1114.
- Vandenhove H**, Vanhoudt N, Cuypers A, Van Hees M, Wannijn J, Horemans N. Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways. *Plant Physiol and Biochem* 2010;48:778–786.
- Vanhoudt N**, Vandenhove H, Horemans N, Wannijn J, Van Hees M, Vangronsveld J, Cuypers A. The combined effect of uranium and gamma radiation on biological responses and oxidative stress induced in *Arabidopsis thaliana*. *J Environ Radioact* 2010;101:921–930.
- Van Leene J**, Stals H, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Van Isterdael G, De Clercq A, Bonnet E, Laukens K, Remmerie N, Henderickx K, De Vijlder T, Abdelkrim A, Pharazyn A, Van Onckelen H, Inzé D, Witters E, De Jaeger G. A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1226–1238.
- Van Leene J**, Hollunder J, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Stals H, Van Isterdael G, Verkest A, Neiryneck S, Buffel Y, De Bodt S, Maere S, Laukens K, Pharazyn A, Ferreira PCG, Eloy N, Renne C, Meyer C, Faure J-D, Steinbrenner J, Beynon J, Larkin JC, Van de Peer Y, Hilson P, Kuiper M, De Veylder L, Van Onckelen H, Inzé D, Witters E, De Jaeger G. Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol* 2010;10:397–409.
- Vaughn S**, Berhow MA. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Ind Crops Prod* 2005;21:193–202.
- Velasco P**, Cartea ME, Gonzalez C, Vilar M, Ordas A. Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group). *J Agric Food Chem* 2007;55:955–962.
- Verhagen H**, De Vries A, Nijhoff WA, Schouten A, Van Poppel G, Peters WHM, Van den Berg H. Effects of Brussels sprouts on oxidative DNA-damage in man. *Cancer Lett* 1997;114:283–286.
- Verhoeven DT**, Goldbohm RA, van Poppel G, Verhagen H, van den Brandt PA. Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5:733–748.
- Vig AP**, Rampal G, Thind TS, Arora S. Bio-protective effects of glucosinolates. A review. *LWT-Food Sci Technol* 2009;42:1561–1572.
- Voisine R**, Vezina LP, Willemot C. Modification of phospholipid catabolism in microsomal membranes of  $\gamma$ -irradiated cauliflower (*Brassica oleracea L.*) *Plant Physiol* 1993;102:213–218.
- Wada H**, Koshiba T, Matsui T, Sato M. Involvement of peroxidase in differential sensitivity to  $\gamma$ -radiation in seedlings of two *Nicotiana* species. *Plant Science* 1998;132:109–119.

- Wang TT**, Schoene NW, Milner JA, Kim YS. Broccoli-derived phytochemicals indole-3-carbinol and 3,30-diindolylmethane exerts concentration-dependent pleiotropic effects on prostate cancer cells: comparison with other cancer preventive phytochemicals. *Mol Carcinog*. 2012;51:244–256.
- Wang W**, Vignani R, Scali M, Cresti M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* 2006;27:2782–2786.
- Wang W**, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 2004;9:244–252.
- Wardman P**. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues : progress, pitfalls, and prospects. *Free Rad Biol Med* 2007;43:995–1022.
- Weigel D**, Mott R. The 1001 genomes project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol* 2009;10:107.
- West CE**, Waterworth WM, Jiang Q, Bray CM. Arabidopsis DNA ligase IV is induced by gamma irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4. *Plant J* 2000;24:67–78.
- Wi SG**, Chung BY, Kim JS, Kim JH, Baek MH, Lee JW, Kim YS. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron* 2007;38:553–564.
- Winde I**, Wittstock U. Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolates-myrosinase system. *Phytochem* 2011;72:1566–1575.
- Wittstock U**, Halkier BA. Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *J Biol Chem* 2000;275:14659–14666.
- Wittstock U**, Burow M. Glucosinolate breakdown in Arabidopsis: mechanism, regulation and biological significance. *Arabidopsis Book* 2010;8 e0134.
- Woodward C**, Bemis SM, Hill EJ, Sawa S, Koshiba T, Torii KU. Interaction of auxin and ERECTA in elaborating Arabidopsis inflorescence architecture revealed by the activation tagging of a new member of the YUCCA family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiol* 2005;139:192–203.
- Wu L**, Noyan Ashraf MH, Facci M, Wang R, Paterson PG, Ferrie A, Juurlink BHJ. Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *PNAS* 2004;101:7094–7099.
- Xiao D**, Lew KL, Zeng Y, Xiao H, Marynowski SW, Dhir R, Singh SV. Phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells is mediated by reactive oxygen species-dependent disruption of the mitochondrial membrane potential. *Carcinogenesis* 2006;27:2223–2234.
- Xu J**, Li Y, Wang Y, Liu H, Lei L, Yang H, Liu G, Ren D. Activation of MAPK Kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2008;283:26996–27006.
- Xue J**, Jørgensen M, Pihlgren U, Rask L. The myrosinase gene family in *Arabidopsis thaliana*: gene organization, expression and evolution. *Plant Mol Biol* 1995;27:911–922.



- Yamada K**, Nagano AJ, Ogasawara K, Hara-Nishimura I, Nishimura M. The ER body, a new organelle in *Arabidopsis thaliana*, requires NAI2 for its formation and accumulates specific  $\beta$ -glucosidases. *Plant Signal Behav* 2009;4:849–852.
- Yan X**, Chen S. Regulation of plant glucosinolates metabolism. *Planta* 2007;226:1343–1352.
- Yanaka A**, Fahey JW, Fukumoto A, Nakayama M, Inoue S, Zhang S, Tauchi M, Suzuki H, Hyodo I, Yamamoto M.. Dietary sulforaphane-rich broccoli sprouts reduce colonization and attenuate gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice and humans. *Cancer Prev Res* 2009;2(4):353–360.
- Zaka R**, Vandecasteele CM, Misset MT. Effects of low chronic doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G6PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae). *J Exp Bot* 2002a;53:1979–1987.
- Zaka R**, Chenal C, Misset MT. Study of external low irradiation dose effects on induction of chromosome aberrations in *Pisum sativum* root tip meristem. *Mut Res* 2002b;517: 87–99.
- Zaka R**, Chenal C, Misset MT. Effects of low doses of short-term gamma irradiation on growth and development through two generation of *Pisum sativum*. *Sci Total Environ* 2004;320:121–129.
- Zhang Y**, Talalay P, Cho CG, Posner GH. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992;89:2399–2403.
- Zhang J**, Hsu B A JC, Kineth B A MA, Bjeldanes LF, Firestone GL. Indole-3-carbinol induces G1 cell cycle arrest and inhibits prostate-specific antigen production in human LNCaP prostate carcinoma cells. *Cancer* 2003;98:2511–2520.
- Zhang Z**, Ober JA, Kliebenstein DJ. The gene controlling the quantitative trait locus EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1 alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006;18:1524–1536.
- Zhao Y**, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza J. Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev* 2002;16:3100–3112.
- Zhu S**, Jeong RD, Venugopal SC, Lapchuk L, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P. SAG101 forms a ternary complex with EDS1 and PAD4 and is required for resistance signaling against turnip crinkle virus. *PLoS Pathog* 2011;7(11):e1002318. doi:10.1371/journal.ppat.1002318.
- Zhu CY**, Loft S. Effects of Brussels sprouts extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food Chem Toxicol* 2001;39:1191–1197.
- Zhu CY**, Loft S. Effect of chemopreventive compounds from Brassica vegetables on NAD(P)H : quinone reductase and induction of DNA strand breaks in murine hepa1c7c cells. *Food Chem Toxicol* 2003;41:455–462.



## *ANNEXES*

---



### *Liste des annexes*

Annexe n° 1 : Matériel supplémentaire de l'article "Application of proteomics to the assessment of the response to ionising radiation in *Arabidopsis thaliana*" : Figure S1, Table S1, S2, S3 et S4, légende de Table S5 (disponible en ligne : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391911001278>).

Annexe n° 2 : Matériel supplémentaire de l'article "Kinetic transcriptomic approach revealed metabolic pathways and genotoxic-related changes implied in the Arabidopsis response to ionising radiations" : Table S2, S4, S5 et S6, légendes de Table S1 et S2 (disponibles en ligne : [http://urgv.evry.inra.fr/cgi-bin/projects/CATdb/consult\\_project.pl?project\\_id=216](http://urgv.evry.inra.fr/cgi-bin/projects/CATdb/consult_project.pl?project_id=216) et <http://www.journals.elsevier.com/plant-science/>).

Annexe n° 3 : Figures correspondants aux expériences d'apports exogènes en sinigrine, AITC et I3C sur *Arabidopsis thaliana*, écotype *Ler* (Figure 45 et Tableau 17).

Annexe n° 4 : Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* au 11<sup>ème</sup> jour de culture en fonction de l'irradiation et de la concentration du milieu en différentes molécules (glucosinolates, molécules antioxydantes ou pro-oxydantes) (Figure 46).

Annexe n° 5 : Tests de significativité de l'interaction entre l'effet de l'apport de molécule dans le milieu (glucosinolates, antioxydants ou pro-oxydants) et l'effet d'une irradiation à la dose 40 Gy sur la croissance racinaire d'*A. thaliana* (Tableau 18).

Annexe n° 6 : Figures correspondants aux expériences d'apports exogènes de molécules sur *Pisum sativum* et *Allium cepa* (Figures 47, 48, 49, 50 51 et 52).

Annexe n° 7 : Teneurs en familles de glucosinolates et en certains glucosinolates particuliers dans les feuilles de plantules de trois semaines et dans les graines de certains écotypes naturels d'*A. thaliana* mesurés par Kliebenstein *et al.* 2001a (Tableau 19 et 20).

Annexe n° 1 : Matériel supplémentaire de l'article "Application of proteomics to the assessment of the response to ionising radiation in *Arabidopsis thaliana*" (cf Chapitre 1 – 2.3.).

Fig. S1 – Pictures of the 2-DE gels used for the comparative analysis of *Arabidopsis* plantlet proteome after IR treatment (10 and 40 Gy).

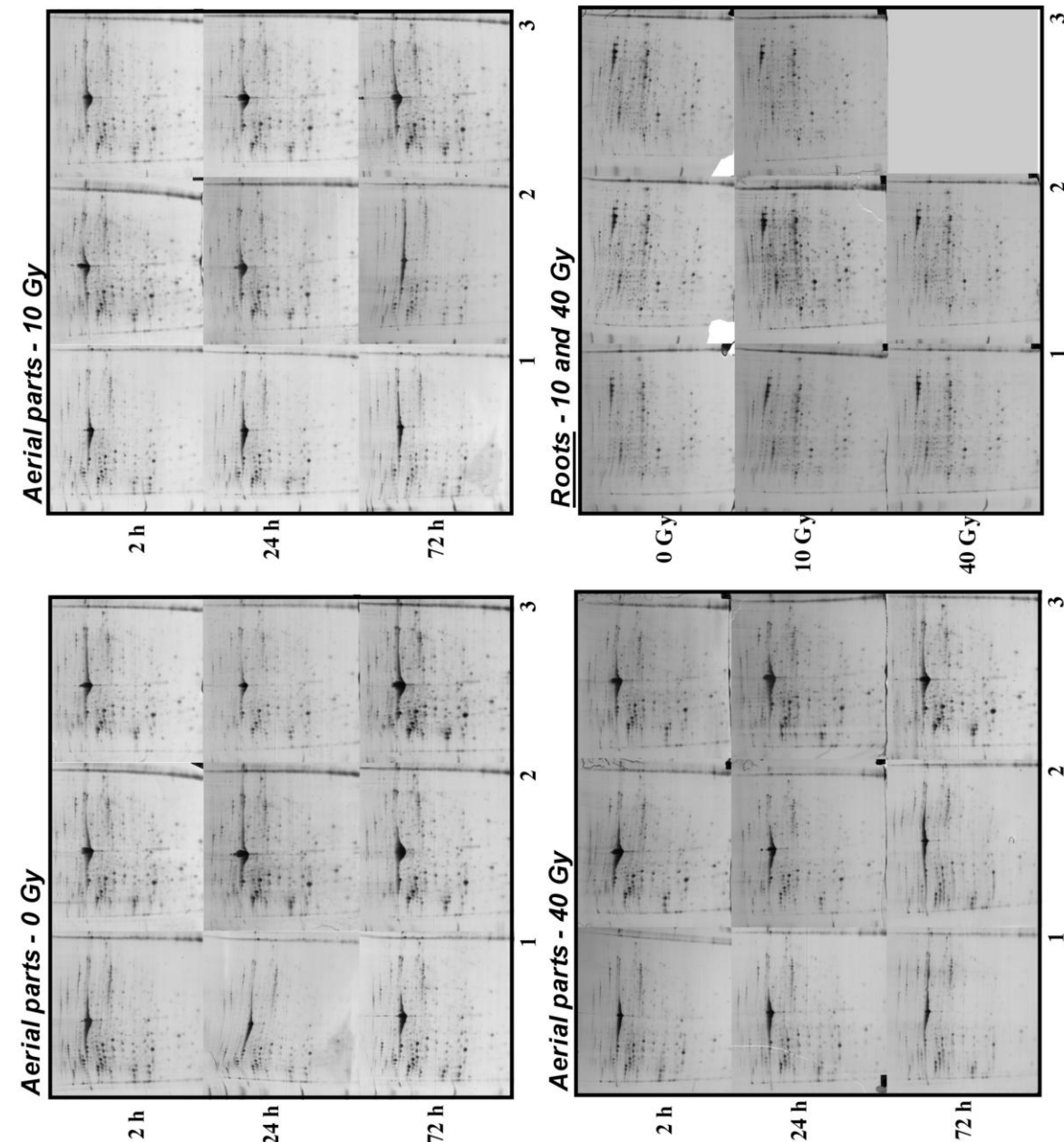
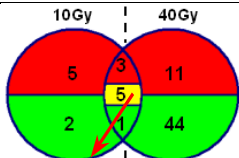
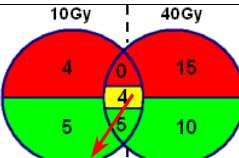
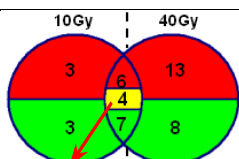
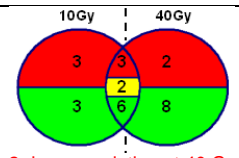


Table S1 – Complete list of spot values obtained from PDQuest comparative analysis of 2-DE gels after applying local regression method (LOESS) normalisation. Values are expressed in ppm from sum of volumes of all spots on the gel.

→ Disponible en ligne :

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391911001278>

**Table S2 – Data related to the aerial part and the root protein extracts and to the corresponding 2-DE gels. Sample annotation: t0, t2, t24 and t72 correspond to the time points 0 h, 2 h, 24 h and 72 h. F1, F2 and F3 correspond to the 3 aerial part replicates and R1, R2 and R3 correspond to the 3 root replicates. Quantitative differences are shown in the corresponding Venn diagrams: green = down-regulated spots; red = up-regulated spots; yellow = spots oppositely regulated by the 10 and 40 Gy doses.**

Sample	Proteins in extracts mg.mL <sup>-1</sup>	Proteins loaded µg	Number of spots on the 2D-gel				Quantitative differences (means ↓↑)	
			Matched	Unmatched	Means of matched	TOTAL		
<b>Aerial parts</b>								
0Gy t <sub>0</sub> F1	8.34	300	<b>737</b>	0		<b>Master gel</b>		
0Gy t <sub>2</sub> F1	10.30	300	696	10		706		
0Gy t <sub>2</sub> F2	3.05	300	673	12	674 ± 22	685	684 ± 23	control
0Gy t <sub>2</sub> F3	6.71	300	652	8		660		
10Gy t <sub>2</sub> F1	9.23	300	667	4		671		
10Gy t <sub>2</sub> F2	4.78	300	678	22	674 ± 6	700	689 ± 16	
10Gy t <sub>2</sub> F3	5.59	300	677	19		696		
40Gy t <sub>2</sub> F1	13.14	300	630	3		633		
40Gy t <sub>2</sub> F2	3.99	300	638	11	632 ± 5	649	640 ± 8	
40Gy t <sub>2</sub> F3	4.17	300	628	10		638		3 down regulations at 40 Gy
0Gy t <sub>24</sub> F1	5.77	300	628	4		632		
0Gy t <sub>24</sub> F2	2.43	300	639	2	609 ± 43	641	612 ± 43	control
0Gy t <sub>24</sub> F3	6.55	300	559	4		563		
10Gy t <sub>24</sub> F1	9.41	300	635	2		637		
10Gy t <sub>24</sub> F2	4.17	300	580	6	607 ± 27	586	612 ± 25	
10Gy t <sub>24</sub> F3	3.46	300	605	8		613		
40Gy t <sub>24</sub> F1	10.65	300	627	4		631		
40Gy t <sub>24</sub> F2	7.72	300	588	15	609 ± 20	603	624 ± 18	
40Gy t <sub>24</sub> F3	3.20	300	611	26		637		3 down regulations at 40 Gy
0Gy t <sub>72</sub> F1	8.70	300	658	1		659		
0Gy t <sub>72</sub> F2	3.46	300	639	5	644 ± 12	644	648 ± 10	control
0Gy t <sub>72</sub> F3	3.87	300	636	5		641		
10Gy t <sub>72</sub> F1	9.76	300	647	3		650		
10Gy t <sub>72</sub> F2	9.76	300	601	2	619 ± 24	603	623 ± 24	
10Gy t <sub>72</sub> F3	3.23	300	610	7		617		
40Gy t <sub>72</sub> F1	10.30	300	593	5		598		
40Gy t <sub>72</sub> F2	4.70	300	583	5	588 ± 5	588	593 ± 5	
40Gy t <sub>72</sub> F3	3.91	300	588	6		594		1 down regulation, at 40 Gy
<b>Roots</b>								
<b>Master gel</b>			<b>658</b>	<b>6</b>		<b>664</b>		
0Gy R1	2.28	400	675	0		675		
0Gy R2	2.93	400	688	1	679 ± 8	689	680 ± 8	control
0Gy R3	3.37	400	673	2		675		
10Gy R1	3.22	400	683	2		685		
10Gy R2	2.99	400	699	4	681 ± 19	703	684 ± 19	
10Gy R3	2.66	400	662	2		664		
40Gy R1	2.51	400	662	1		663		
40Gy R2	2.34	400	659	2	660 ± 2	661	662 ± 1	

**Table S3 – List and means values (ppm) of the 145 differentially variant spots in the 2-DE analysis of aerial part proteins of *A. thaliana*, 2 h, 24 h and 72 h after treatment with 10 and 40 Gy of ionising radiation. Mw: Molecular Weight; \*P anova: p values resulting of one-ways ANOVAs ( $\alpha=0.05$ ) performed on spot values after cubic root transformation, between irradiated conditions and the corresponding non-irradiated control for each time point (**bold**: mean spot values corresponding to the significant comparisons); \*\* kinetic point of the significant difference; \*\*\* a, b and c: classes given by the Duncan test ( $\alpha=0.05$ ).**

Spot	Mw (kDA)	Isoelectric point	Relative volume (ppm)												Kinetic Point**	P anova*	Duncan test***		
			2 h				24 h				72 h						0 Gy	10 Gy	40 Gy
			0 Gy	10 Gy	40 Gy	0 Gy	10 Gy	40 Gy	0 Gy	10 Gy	40 Gy								
L0802	171.66	5	1179.9	1218.5	1416.0	355.4	602.3	1713.0	<b>15.6</b>	<b>193.4</b>	<b>1154.4</b>	0.023	a	a	b				
L1116	38.6	5.23	17299.9	16664.7	26330.6	<b>17003.7</b>	<b>18097.1</b>	16670.4	16670.4	14796.1	26116.0	0.012	a	a	b				
L1120	28.24	5.09	1206.2	2928.3	171.1	<b>754.5</b>	<b>1514.7</b>	46.9	2693.0	4112.3	45.3	0.018	b	b	a				
L1121	33.33	5.2	812.1	1176.6	210.6	2.5	76.5	105.3	<b>161.3</b>	<b>0.0</b>	<b>2.5</b>	0.029	a	0	0				
L1405	72.52	5.15	<b>4666.8</b>	<b>4630.6</b>	<b>9818.3</b>	4953.2	8992.2	15638.7	7597.6	5132.5	8319.2	0.005	a	a	b				
L1506	96.41	5.24	<b>673.0</b>	<b>819.5</b>	<b>169.5</b>	733.9	919.9	301.1	879.6	1179.9	325.0	0.002	b	b	a				
L1509	85.22	5.38	129.2	254.2	227.1	134.1	93.8	17.3	<b>189.2</b>	<b>2.5</b>	<b>0.0</b>	0.000	a	0	0				
L1607	125.12	5.36	409.7	85.6	287.2	<b>0.0</b>	<b>7.4</b>	<b>1272.0</b>	6.6	0.0	406.5	0.001	0	0	b				
L1609	96.1	5.18	<b>876.3</b>	<b>639.3</b>	<b>125.1</b>	712.5	642.6	126.7	443.5	258.4	81.5	0.005	b	b	a				
L2005	10.5	5.46	<b>20.6</b>	<b>153.0</b>	<b>0.0</b>	1.6	14.0	185.9	<b>2.5</b>	<b>5.8</b>	<b>32.9</b>	0.024	a	b	0				
L2201	48.41	5.28	1644.7	1389.7	2118.7	1183.2	604.7	1607.7	<b>129.2</b>	<b>686.2</b>	<b>2288.2</b>	0.005	a	b	c				
L2205	53.11	5.43	1533.7	1055.6	772.6	<b>134.1</b>	<b>56.8</b>	<b>647.5</b>	112.7	85.6	1004.6	0.019	a	a	b				
L2210	41.5	5.41	135.8	123.4	80.6	<b>0.0</b>	<b>3.3</b>	<b>356.3</b>	17.3	44.4	12.3	0.011	a	a	b				
L2213	45.17	5.52	<b>240.3</b>	<b>0.0</b>	<b>1122.3</b>	33.7	9.9	124.2	93.8	12.3	17.3	0.006	a	0	b				
L2305	57.13	5.32	<b>853.2</b>	<b>3621.9</b>	<b>845.0</b>	956.1	2507.8	900.1	480.5	1230.9	0.0	0.003	a	b	a				
L2311	54.89	5.41	<b>116.0</b>	<b>69.1</b>	<b>1173.3</b>	98.7	0.0	726.5	32.9	182.7	69.1	0.042	a	a	b				
L2401	66.22	5.31	<b>2431.3</b>	<b>1917.9</b>	<b>8277.2</b>	2894.6	4410.1	7893.0	3863.8	3647.4	11883.5	0.039	a	a	b				
L2405	86.2	5.4	<b>11696.7</b>	<b>10975.9</b>	<b>18629.5</b>	8800.5	12323.7	19477.0	11221.1	13865.6	20873.2	0.024	a	a	b				
L2407	81.34	5.39	<b>180.2</b>	<b>151.4</b>	<b>51.0</b>	190.9	337.3	156.3	285.8	174.4	217.2	0.048	b	b	a				
L2409	70.3	5.44	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>808.8</b>	0.0	0.0	721.6	0.0	0.0	2073.4	0.003	0	0	b				
L2502	92.94	5.4	432.8	2106.3	1670.3	434.4	1107.5	2496.3	<b>665.6</b>	<b>2009.2</b>	<b>4526.1</b>	0.027	a	ab	b				
L2503	84.34	5.44	510.9	741.3	213.9	502.7	604.7	307.7	<b>872.2</b>	<b>353.8</b>	<b>264.1</b>	0.025	b	a	a				
L2714	128.62	5.45	<b>0.0</b>	<b>240.3</b>	<b>687.0</b>	<b>235.3</b>	<b>0.0</b>	<b>2128.5</b>	0.0	0.0	260.0	0.022	0	a	a				
L2715	154.76	5.39	847.5	530.7	320.9	<b>1750.9</b>	<b>566.9</b>	<b>302.8</b>	1319.7	901.8	525.8	0.007	a	a	b				
L2809	210.96	5.43	593.2	705.9	139.1	730.6	462.4	259.2	<b>101.2</b>	<b>1201.3</b>	<b>442.7</b>	0.036	b	a	a				
L2908	235.85	5.53	<b>369.4</b>	<b>356.3</b>	<b>0.0</b>	76.5	158.8	188.4	<b>0.0</b>	<b>367.0</b>	<b>538.9</b>	0.028	a	b	ab				
L2910	238.9	5.44	<b>28.0</b>	<b>167.8</b>	<b>0.0</b>	14.8	81.5	2.5	129.2	523.3	156.3	0.00	a	a	0				
L3103	37.87	5.6	<b>4598.5</b>	<b>3739.6</b>	<b>1214.4</b>	4592.8	3538.0	2433.0	4120.5	3101.1	2531.7	0.001	b	b	a				
L3105	34.36	5.48	<b>261.6</b>	<b>448.4</b>	<b>32.1</b>	140.7	50.2	52.7	204.9	98.6	79.8	0.002	b	b	a				



L3107	30.95	5.52	457.5	449.2	316.8	42.0	483.8	55.1	248.5	27.2	331.6	24 h	0.038	a	b	a
L3108	34.55	5.62	541.4	463.2	37.0	73.2	148.1	37.0	75.7	17.3	19.7	2 h	0.025	b	b	a
L3305	62.88	5.62	1289.5.5	11917.2	18748.8	13586.6	14889.1	19569.1	13438.5	11116.6	15748.9	2 h	0.044	a	a	b
L3311	54.67	5.62	1650.5	745.4	91.3	1179.1	1200.4	339.8	746.3	928.9	813.7	2 h	0.022	ab	a	b
L3402	66.27	5.47	28967.8	25693.1	24827.5	23964.4	20423.2	30306.5	26883.7	22539.4	33709.5	2 h	0.046	b	ab	a
L3405	67.27	5.56	2882.2	2879.7	2866.6	2985.9	3394.0	2567.9	3974.1	2504.6	2506.2	2 h	0.027	ab	a	b
L3503	84.86	5.49	854.1	1017.0	556.2	1116.5	868.0	600.6	1010.4	701.0	716.6	2 h	0.011	b	a	a
L3508	91.96	5.6	14296.7	11488.5	18998.1	10075.0	14830.7	19594.6	11639.9	13371.1	18039.6	2 h	0.025	b	b	a
L3613	117.17	5.67	676.3	477.2	681.3	102.8	213.1	758.6	529.1	590.8	97.1	2 h	0.007	a	a	b
L3614	142.65	5.5	343.1	117.7	104.5	559.5	109.4	111.1	376.0	108.6	437.7	2 h	0.034	b	b	a
L3703	155.19	5.51	257.5	272.3	171.1	231.2	92.2	192.5	50.2	269.1	364.5	24 h	0.005	b	a	a
L3712	165.17	5.55	197.5	160.4	148.9	246.8	118.5	135.8	150.6	127.5	313.5	24 h	0.003	b	a	b
L3808	218.58	5.61	126.7	57.6	129.2	39.5	102.8	155.5	62.5	385.1	0.0	24 h	0.013	a	b	b
L3810	218.3	5.65	243.5	128.4	366.1	351.3	131.6	81.21	116.0	684.6	488.7	2 h	0.03	b	a	a
L4005	23.91	5.8	2504.6	3533.9	1353.5	1885.0	2287.3	2363.9	3280.4	2444.5	807.2	2 h	0.036	a	a	0
L4010	10.88	5.94	157.2	302.8	22.2	9.1	9.1	239.4	24.7	0.0	3.3	2 h	0.029	ab	a	b
L4103	37.71	5.75	4474.3	3470.5	1597.0	4069.5	4116.4	2638.7	3947.7	2980.9	3558.5	2 h	0.020	b	b	a
L4211	42.94	5.82	205.7	71.6	425.4	0.0	0.0	269.9	0.8	152.2	150.6	2 h	0.019	a	0	0
L4303	62.26	5.74	29839.1	26526.6	28539.9	15440.4	28005.9	34164.5	26568.5	18132.5	33322.0	24 h	0.016	b	b	a
L4305	63.16	5.81	1515.6	1383.1	1655.4	1665.3	1742.7	2432.2	1363.4	650.8	2103.0	24 h	0.026	0	0	b
L4307	57.37	5.88	580.9	583.4	427.8	655.8	762.7	473.1	678.0	507.7	522.5	24 h	0.025	ab	a	b
L4403	69.95	5.71	7615.7	6781.4	8867.2	8373.5	5515.1	11385.7	5103.7	7189.5	8739.6	24 h	0.004	b	a	b
L4417	66.97	5.93	379.3	369.4	738.9	476.4	657.4	1284.4	156.3	2400.9	255.9	24 h	0.031	ab	b	a
L4420	71.29	5.8	770.1	1490.1	243.5	710.9	464.9	373.5	90.5	235.3	910.0	2 h	0.028	ab	a	b
L4509	87.57	5.87	1255.6	1035.9	436.9	1014.5	1277.0	386.7	964.3	798.9	818.7	2 h	0.037	b	b	a
L4603	139.96	5.82	575.9	413.0	794.0	581.7	628.6	1010.4	519.2	261.6	420.4	2 h	0.04	b	b	a
L4712	123.43	5.84	607.2	682.9	426.2	543.9	456.6	802.2	385.9	458.3	896.0	24 h	0.016	b	b	a
L4806	219	5.83	1004.6	970.1	1244.9	1384.7	850.8	1290.9	441.8	1153.5	1083.6	24 h	0.040	a	a	b
L4807	228.63	5.84	95.4	144.8	68.3	168.7	113.5	89.7	46.1	46.1	189.2	2 h	0.023	a	b	b
L4809	221.73	5.87	209.0	185.1	307.7	305.3	219.7	526.6	42.8	156.3	259.2	2 h	0.049	a	a	b
												2 h	0.034	a	a	b

L5002	8.19	5.94	1825.8	2094.8	1916.3	856.5	116.8	1690.0	260.0	246.0	877.9	24 h	0.031	ab	a	b
L5011	14.27	6.05	1072.1	1326.3	932.2	469.0	204.1	594.9	5.8	36.2	89.7	72 h	0.047	a	ab	b
L5013	20.17	6.06	111.9	575.9	19.7	42.0	202.4	1.6	102.8	263.3	1.6	2 h	0.014	a	b	a
L5109	34.06	6.02	55.1	46.9	201.6	46.1	5.8	7.4	40.3	46.9	0.0	72 h	0.037	a	a	0
L5112	32.51	6.02	207.3	277.3	413.0	4.1	0.0	239.4	3.3	8.2	39.5	24 h	0.002	a	0	b
L5114	31.89	6.16	743.0	1027.7	0.0	0.0	0.0	0.8	410.6	4.9	727.3	2 h	0.034	b	b	0
L5202	42.86	5.93	942.9	1158.5	1638.2	746.3	199.1	1797.8	88.9	655.8	1034.2	72 h	0.026	a	b	b
L5204	45.7	5.96	3621.1	3544.6	1723.7	3027.0	2418.2	2107.2	3662.2	2985.9	2713.5	2 h	0.044	b	b	a
L5210	52.4	6.15	716.6	769.3	352.2	363.7	909.2	193.4	869.7	590.8	270.7	2 h	0.042	b	b	a
L5213	52.96	6.02	53.5	286.3	801.4	51.0	22.2	64.2	167.8	64.2	66.6	2 h	0.006	a	b	c
L5215	42.53	6.18	357.1	135.8	134.1	75.7	106.1	47.7	74.1	5.8	22.2	72 h	0.017	b	a	a
L5222	39.64	6.35	93.0	9.1	11.5	24.7	241.1	0.0	67.5	90.5	0.8	24 h	0.038	a	b	0
L5308	57.31	5.96	303.6	220.5	264.9	92.2	403.2	233.7	204.9	325.0	392.5	24 h	0.027	a	b	ab
L5311	55.48	6.18	202.4	65.8	701.0	115.2	0.0	108.6	0.0	175.3	7.4	72 h	0.004	0	b	0
L5312	57.62	6.2	26.3	57.6	0.0	11.5	88.9	18.1	52.7	28.0	24.7	2 h	0.033	b	b	0
L5413	65.33	6.18	2154.9	2269.2	1081.1	1404.5	1038.4	980.8	1644.7	1454.7	807.2	2 h	0.010	b	b	a
L5415	74.31	6.19	78.2	10.7	308.5	18.9	72.4	153.0	12.3	74.9	6.6	72 h	0.044	a	b	ab
L5608	137.76	6.02	892.7	520.0	325.8	1109.1	555.4	1002.2	1113.2	929.7	1104.2	2 h	0.028	b	ab	a
L5609	119.32	6.12	594.9	665.6	303.6	646.7	469.0	111.1	569.4	679.6	409.7	24 h	0.004	b	b	a
L5614	125.06	6.12	229.6	246.0	0.0	107.8	329.9	1.6	69.9	69.1	0.0	2 h	0.005	b	b	0
L5702	187.01	5.92	95.4	86.4	197.5	121.8	64.2	223.8	190.1	297.8	5.8	72 h	0.026	b	b	a
L5804	239.89	6.11	133.3	70.8	1895.7	113.5	0.0	216.4	156.3	165.4	9.9	2 h	0.042	a	a	b
L6006	9.2	6.53	0.8	0.0	14.8	12.3	2.5	18.1	0.0	0.8	0.0	24 h	0.008	b	a	b
L6118	33.89	6.55	51.0	4.1	1.6	2.5	37.8	0.0	159.6	61.7	51.8	24 h	0.003	a	b	0
L6204	55.3	6.4	1294.2	1025.2	1881.7	1227.6	1444.0	1764.9	1611.0	1969.7	774.2	72 h	0.013	b	b	a
L6213	45.92	6.43	363.7	133.3	238.6	0.0	144.0	0.0	152.2	60.9	205.7	24 h	0.002	0	a	0
L6217	38.22	6.37	209.0	49.4	233.7	59.2	0.0	513.4	0.0	14.8	0.0	24 h	0.002	a	0	b
L6302	59.45	6.4	831.8	948.7	1340.3	543.0	678.8	585.0	560.3	680.4	271.5	72 h	0.013	b	b	a
L6305	62.42	6.22	348.9	420.4	326.6	602.3	0.0	0.0	253.4	0.0	25.5	24 h	0.002	a	0	0
L6409	65.9	6.45	159.6	132.5	519.2	4.1	21.4	534.0	67.5	34.6	626.1	24 h	0.012	a	a	b
L6509	74.39	6.55	311.0	111.1	255.9	102.0	139.9	0.0	80.6	14.8	0.0	24 h	0.019	a	a	0
L6606	107.42	6.43	3197.3	466.5	1456.3	0.0	512.6	664.0	1900.6	520.0	1685.9	2 h	0.03	b	a	ab
												24 h	0.05	0	a	a

L6608	144.5	6.51	362.8	377.7	292.1	626.1	617.9	342.3	724.9	645.9	702.7	24 h	0.029	b	b	a
L6613	130.01	6.52	172.0	182.7	4.9	194.2	87.2	178.5	388.4	447.6	409.7	2 h	0.018	b	b	0
L6711	161.52	6.33	244.4	269.1	262.5	199.1	153.9	94.6	125.1	250.1	37.0	72 h	0.023	ab	b	a
L6717	145.37	6.44	46.1	64.2	9.9	26.3	43.6	66.6	150.6	55.9	86.4	2 h	0.026	b	b	a
L6814	183.16	6.39	54.3	61.7	0.0	76.5	23.0	9.9	36.2	142.3	74.9	2 h	0.000	b	b	0
L6920	242.07	6.37	0.0	255.1	0.0	89.7	300.3	283.0	0.0	306.1	265.8	2 h	0.000	0	a	0
L7109	33.38	6.7	17.3	2.5	0.8	3.3	19.7	0.0	40.3	4.1	2.5	72 h	0.033	b	a	a
L7206	54.01	6.87	3477.9	3326.5	2298.0	3415.4	2942.3	3384.1	3212.2	2866.6	2498.8	2 h	0.020	b	b	a
L7208	52.49	6.83	219.7	142.3	7.4	93.8	100.4	0.0	190.9	45.3	14.8	2 h	0.013	b	b	a
L7209	48.44	6.78	203.2	37.8	98.7	38.7	75.7	376.8	113.5	81.5	106.1	2 h	0.020	b	a	ab
L7218	38.33	6.91	829.4	826.1	5.8	324.2	418.8	16.5	505.2	217.2	299.5	2 h	0.014	b	b	a
L7312	57.66	6.95	3165.3	3375.1	6486.0	4204.4	3720.6	5773.5	2996.6	4076.1	5723.3	2 h	0.038	a	a	b
L7314	51.07	6.93	120.1	155.5	6.6	24.7	22.2	59.2	42.0	46.9	0.0	2 h	0.016	b	b	a
L7407	69.98	6.79	233.7	315.1	246.8	276.1	32.1	273.2	142.3	258.4	110.3	24 h	0.016	b	a	b
L7412	58.6	6.68	2498.0	965.9	2223.2	760.3	1346.1	3302.7	1477.7	1593.7	1082.0	24 h	0.03	a	ab	b
L7415	62.97	6.93	164.6	55.1	121.8	172.8	277.3	320.1	273.2	73.2	524.9	72 h	0.041	ab	a	b
L7417	69.75	6.94	185.1	336.5	0.0	4.9	14.8	0.0	0.0	122.6	1.6	2 h	0.007	b	b	0
L7514	78.19	6.85	288.0	38.7	0.0	374.4	211.5	395.8	0.0	0.0	179.4	2 h	0.007	b	a	0
L7515	83.65	6.73	377.7	534.0	470.6	483.8	467.3	520.8	994.7	464.9	120.1	72 h	0.025	b	b	a
L7601	128.87	6.69	97.1	74.1	28.8	280.6	237.8	30.4	255.9	236.1	93.8	24 h	0.01	b	b	a
L7602	136.06	6.73	388.4	428.7	111.1	420.4	528.2	115.2	590.8	789.9	328.3	2 h	0.001	b	b	a
L7613	102.29	6.7	1242.4	1104.2	569.4	701.0	757.0	819.5	1182.3	780.0	1209.5	2 h	0.002	b	b	a
L7714	147.86	6.63	191.7	153.0	43.6	200.8	147.3	55.9	284.7	238.6	61.7	2 h	0.022	b	b	a
L7718	143.22	6.67	127.5	172.0	18.1	83.9	112.7	52.7	192.5	181.0	260.8	2 h	0.041	b	b	a
L7810	193.37	6.92	798.1	832.7	28.8	1120.6	499.4	276.5	883.7	1235.0	531.5	2 h	0.004	b	b	a
L7811	193.35	7	692.8	478.0	48.5	802.2	880.4	110.3	864.7	870.5	761.9	2 h	0.009	b	b	a
L7812	172.79	6.74	47.7	159.6	19.7	93.8	93.0	61.7	109.4	211.5	116.8	2 h	0.009	a	b	a
L8007	25.02	7.08	250.9	278.1	9.9	4.9	18.1	3.3	35.4	40.3	47.7	2 h	0.013	b	b	a
L8102	32.84	7.03	203.2	353.8	2.5	23.9	357.9	0.8	55.9	38.7	190.1	2 h	0.016	b	b	a
												24 h	0.018	a	b	0

L8107	36.76	7.08	469.8	227.1	795.6	436.9	348.9	0.8	5.8	108.6	72 h	0.016	a	a	b
L8109	39.16	7.43	1500.8	1369.9	1550.1	1495.8	1873.5	1210.3	1097.6	2581.1	72 h	0.012	a	a	b
L8111	34.17	7.36	391.6	158.8	20.6	13.2	9.9	116.0	19.7	66.6	2 h	0.015	b	ab	a
L8201	55.91	7.05	305.3	147.3	628.6	180.2	246.8	356.3	208.2	172.8	2 h	0.007	a	a	b
L8202	44.58	7.07	1918.7	1644.7	1419.3	1407.8	1461.3	793.2	348.0	2120.3	72 h	0.027	ab	a	b
L8208	44.75	7.19	428.7	371.9	388.4	238.6	74.1	381.8	116.8	348.0	24 h	0.024	b	a	b
L8213	50.61	7.67	1094.3	198.3	213.1	41.1	6.6	303.6	170.3	136.6	24 h	0.001	a	a	b
L8214	47.38	7.19	554.6	137.4	518.4	366.1	373.5	258.4	86.4	847.5	24 h	0.048	b	a	b
L8311	57.64	7.46	2714.4	2593.4	403.2	1991.1	1362.5	288.0	2124.4	1702.3	2 h	0.01	b	b	a
L8318	62.58	7.48	6.6	331.6	687.0	300.3	752.8	274.8	563.6	494.5	2 h	0.025	a	b	b
L8322	51.65	7.38	709.2	449.2	180.2	162.9	262.5	281.4	134.9	300.3	2 h	0.037	b	ab	a
L8405	65.72	7.13	348.9	724.9	471.5	32.9	176.9	290.4	128.4	499.4	2 h	0.018	a	b	a
L8412	59.88	7.06	333.2	400.7	15.6	23.9	83.1	1004.6	186.8	140.7	2 h	0.01	b	b	a
L8415	61.45	7.39	94.6	129.2	0.0	120.9	130.8	9.9	312.7	45.3	24 h	0.038	a	a	b
L8416	65.01	7.45	148.1	514.2	0.0	0.0	29.6	125.9	48.5	226.3	2 h	0.039	b	b	0
L8504	97.27	7.19	1843.9	2021.6	2001.0	442.7	523.3	2186.1	652.5	1818.4	2 h	0.000	b	c	0
L8515	97.13	7.56	8185.1	7312.1	4897.2	8467.3	7159.9	6546.9	9972.2	6514.0	24 h	0.043	a	a	b
L8521	86.38	7.57	311.8	302.0	76.5	270.7	345.6	63.4	250.1	219.7	72 h	0.025	b	a	b
L8523	82.89	7.11	58.4	23.9	0.0	37.0	49.4	0.0	63.4	12.3	2 h	0.015	b	b	a
L8524	83.15	7.19	143.2	69.9	0.8	126.7	137.4	23.0	191.7	212.3	2 h	0.038	b	ab	0
L8614	92.45	7.37	1528.7	2873.2	1472.8	2647.7	934.7	1340.3	698.5	3672.1	2 h	0.045	b	ab	a
L8616	91.99	7.32	0.0	0.0	1869.4	817.8	344.7	164.6	0.0	4031.6	24 h	0.03	b	a	ab
L8711	170.39	7.5	107.0	111.9	105.3	109.4	126.7	158.0	98.7	373.5	2 h	0.000	0	0	b
L9405	69.8	7.57	176.1	165.4	0.0	70.8	156.3	42.0	106.1	150.6	72 h	0.039	a	a	b
L9604	97.4	7.5	2840.3	1043.3	2279.1	1157.7	269.9	1328.8	1129.7	458.3	2 h	0.008	b	b	0
											72 h	0.005	a	a	b

**Table S4.** List and means values (ppm) of the 27 differentially variant spots in the 2-DE analysis of roots protein extracts of *A. thaliana* after treatment with ionising radiation (10 and 40 Gy). Mw: Molecular Weight; \*P anova: p values resulting of one-ways ANOVAs ( $\alpha=0.05$ ) performed on spot values after cubic root transformation, between irradiated conditions and the corresponding non-irradiated control for each time point (bold: mean spot values corresponding to the significant comparisons); \*\* a, b and c: classes given by the Duncan test ( $\alpha=0.05$ ).

Spot	Mw (kDA)	Isoelectric point	Relative volume (ppm)			P anova*	Duncan test**		
			0 Gy	10 Gy	40 Gy		0 Gy	10 Gy	40 Gy
<b>R0808</b>	92,58	5.25	988.6	513.7	1544.7	0.016	b	a	b
<b>R1206</b>	41,94	5.52	113.1	93.7	382.8	0.037	a	a	b
<b>R2204</b>	41,08	5.82	846.3	657.3	576.6	0.029	b	a	a
<b>R2308</b>	44,13	5.78	73	85.2	1.8	0.003	b	b	a
<b>R2403</b>	51,89	5.65	598	921.6	693.1	0.036	a	b	ab
<b>R2405</b>	49,8	5.7	518.5	308.5	605.7	0.026	b	a	b
<b>R2409</b>	52,02	5.81	586.7	419.1	195	0.001	c	b	a
<b>R2505</b>	61,84	5.78	6898	3339.1	4519.8	0.01	b	a	a
<b>R2702</b>	70,38	5.64	1613.5	1724.9	1150.8	0.003	b	b	a
<b>R2705</b>	85,42	5.7	405.4	313.3	242.3	0.025	b	ab	a
<b>R3001</b>	25,61	5.86	2551.9	1672.8	1395.2	0.01	b	a	a
<b>R3008</b>	24,06	5.94	9.2	33.6	4.5	0.044	ab	b	a
<b>R3509</b>	59,63	6.04	775.8	346.4	278.1	0.026	b	a	a
<b>R4105</b>	39,1	6.37	1773.4	1807.3	1504.5	0.005	b	b	a
<b>R4205</b>	41,64	6.19	136.3	297.0	365.1	0.039	a	b	b
<b>R4309</b>	42,09	6.37	537.8	849.5	506.3	0.005	a	b	a
<b>R4417</b>	50,29	6.19	335.9	277.8	443.3	0.015	a	a	b
<b>R4802</b>	114,36	6.48	1644	2224.2	1252.7	0.002	b	c	a
<b>R5203</b>	41,27	6.58	384.2	1330	1607.5	0.014	a	b	b
<b>R5308</b>	44,69	6.63	2535.5	2626.4	2188.1	0.023	b	b	a
<b>R5602</b>	65,96	6.49	498	504	246.6	0.039	b	b	a
<b>R5807</b>	86,01	6.75	114.4	230	104.1	0.047	a	b	a
<b>R7509</b>	55,39	7.19	247.8	207.8	113.4	0.033	b	b	a
<b>R7512</b>	61,36	7.23	472.2	639.3	304.6	0.013	b	b	a
<b>R8212</b>	40,1	7.71	608.2	474	226.5	0.00	c	b	a
<b>R8305</b>	43,96	7.52	8755.4	6803.9	7874	0.03	b	a	ab
<b>R8705</b>	72,64	7.59	697.4	927.4	940.2	0.02	a	b	b

**Table S5 – MS/MS identification: peptide and protein information.** This table provides notably sequences, observed and calculated mass of each matched peptides, and the individual ion score and ion score CI % of peptides used for the final protein identification. Search was accomplished by a peptide mass fingerprint search and a combined search (+MS/MS), using GPS explorer<sup>TM</sup> software v 3.5 (Applied Biosystems) in the NCBI<sup>nr</sup> database of proteins using MASCOT with the following parameters: taxonomy restriction to Viridiplantae, one missed cleavage, 100 ppm mass tolerance in MS and 0.2 Da for CID data, cysteine carbamidomethylation as a fixed modification and methionine oxidation as variable modifications. Cut-off score value = 69 ( $p<0.05$ ). Abbreviation: clp = chloroplast.

→ Disponible en ligne :

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391911001278>

**Annexe n° 2 : Matériel supplémentaire de l'article "Kinetic transcriptomic approach revealed metabolic pathways and genotoxic-related changes implied in the Arabidopsis response to ionising radiations" (cf Chapitre 1 – 3.3.).**

**Table S1.** List of the 784 regulated transcripts obtained in the CATMA microarray IR experiment [Gicquel et al. 2012] with the gene description from The Universal Protein Resource (UniProt) website (<http://www.uniprot.org/>) and the MIPS functional classification (Munich Information Center for Protein Sequences - website : [http://mips.helmholtzmuench.de/proj/funcatDB/search\\_main\\_frame.html](http://mips.helmholtzmuench.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html)). Log2-ratio of irradiated condition (10 Gy or 40 Gy) compared to non irradiated control are given for each time point.

→ Disponible en ligne (banque de données CATdb, projet AU09-03\_gamma-irradiation) :

[http://urgv.evry.inra.fr/cgi-bin/projects/CATdb/consult\\_project.pl?project\\_id=216](http://urgv.evry.inra.fr/cgi-bin/projects/CATdb/consult_project.pl?project_id=216)

**Table S3.** List of the genes composing each cluster selected after hierarchical clustering (Genesis software 1.7.4: Pearson uncentered distances, average linkage, 6 clusters) of the 219 highly regulated transcripts in *A. thaliana* after 10 Gy and 40 Gy irradiation treatments (IR10 and IR40). The given positive and negative values are respectively the fold up- or down-regulation compared to the control. Significant differences are in coloured boxes (green for down-regulated and red for up-regulated genes). §: non available data.

→ Disponible en ligne : <http://www.journals.elsevier.com/plant-science/>

Table S2. Over represented functional categories in the IR regulated transcriptome (784 genes), using the online VirtualPlant1.2 software (<http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb2/>) with the following parameters: Classification = MIPS (categories defined by the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) - <http://mips.gsf.de/projects/funecat/>); Method = Fisher Exact Test (with FDR correction); Background population = Arabidopsis thaliana columbia tair10 genome (28,775 genes); p-value cut-off = 0.01. Observed frequency % was calculated over the total number of IR regulated genes reported on MIPS (752).

MIPS Number	Functional categories	Observed Frequency	Expected Frequency	p-value	Genes
1	<b>METABOLISM</b>	23.7%	18.1%	9.8e-05	AT2G29350 AT3G52840 AT5G56100 ATCG00470 AT2G39030 AT3G47540 AT1G30530 AT1G71170 AT3G25780 AT1G06360 AT5G49360 AT3G16910 AT2G39400 AT3G52720 AT4G26530 AT4G34510 AT5G05270 AT5G14930 AT2G43620 AT1G29670 AT4G38970 AT4G24510 AT1G69526 AT1G16410 AT2G26250 AT5G4
01.01	<b>amino acid metabolism</b>	3.1%	1.3%	0.000164	AT2G04400 AT4G37990 AT2G39800 AT4G26200 AT3G22460 AT3G13450 AT1G17745 AT4G31500 AT2G31810 AT5G37600 AT5G54080 AT1G17290 AT3G0775 AT3G47340 AT1G10070 AT2G38400 AT3G61440 AT3G233810 AT1G31180 AT5G19550 AT4G34710 AT5G16570 AT1G03090
01.01.11	metabolism of the pyruvate family (alanine, isoleucine, leucine, valine) and D-alanine	0.9%	0.2%	0.000361	AT1G17290 AT2G38400 AT1G31180 AT1G10070 AT1G03090 AT2G31810 AT3G13450
01.05	<b>C-compound and carbohydrate metabolism</b>	9.6%	6.1%	0.000171	AT2G29350 AT4G39800 AT3G52840 AT4G37800 AT3G09020 AT3G16370 AT2G39030 AT3G01500 AT3G02040 AT3G47540 AT1G30530 AT4G33070 AT1G71170 AT5G20250 AT1G32860 AT4G36610 AT3G23810 AT5G49360 AT3G16910 AT2G39400 AT3G52720 AT2G15490 AT3G60140 AT5G18670 AT3G17770 AT1G05680 AT4G03210 AT1G66430 AT4G26530 AT1G78570 AT5G67460 AT5G14930 AT1G14720 AT2G43620 AT1G33811 ATCG00490 AT1G29670 AT3G57520 AT4G38970 AT4G30280 AT1G69526 AT5G44020 AT5G51830 AT2G18700 AT1G54010 AT3G04290 AT3G01590 AT1G17290 AT2G15480 AT3G60750 AT5G66360 AT1G70290 AT2G30140 AT4G37990 AT2G32020 AT4G19420 AT4G26200 AT4G28780 AT2G43820 AT2G31810 AT4G34138 AT5G56870 AT2G36870 AT5G56350 AT1G01220 AT1G32900 AT1G26810 AT1G66700 AT5G45950 AT5G14180 AT1G22400 AT1G15380
01.20	<b>secondary metabolism</b>	3.6%	1.5%	8.86e-05	AT3G56400 AT1G16410 AT1G54040 AT4G02520 AT5G43450 AT4G26200 AT1G78340 AT5G07990 AT1G18020 AT1G27130 AT3G19710 AT5G17220 AT4G31500 AT1G22640 AT1G17180 AT5G05270 ATCG01070 AT3G25780 AT1G78370 AT3G03190 AT2G47730 AT5G13930 AT1G17170 AT3G45140 AT1G02930 AT4G13770 AT4G34710
01.20.38	metabolism of toxins/drugs	1.3%	0.2%	3.1e-06	AT1G27130 AT5G17220 AT2G47730 AT1G02930 AT4G02520 AT1G78370 AT1G78340 AT3G03190 AT1G17180 AT1G17170

2	<b>ENERGY</b>	3.5%	1.7%	0.000805	AT4G04640 AT2G34430 ATCG00440 ATCG00470 AT3G22370 AT5G51830 ATCG00300 AT1G66430 AT4G26530 AT1G1170 AT3G07800 ATCG01010 AT1G17290 ATCG01080 AT5G56350 AT1G29920 ATCG01060 AT2G05100 AT3G47470 AT4G38970 AT2G05070 ATCG00540 AT1G70290 ATMG00580 AT3G16910 ATCG00130
02.30	<i>photosynthesis</i>	1.3%	0.2%	3.00E-05	ATCG01060 ATCG01010 AT2G34430 ATCG00440 ATCG01080 AT3G47470 AT2G05070 ATCG00300 AT2G05100 AT1G29920
02.45	<i>energy conversion and regeneration</i>	1.2%	0.3%	0.000285	AT3G47470 AT4G04640 AT2G05070 AT1G29920 AT2G34430 ATCG00470 AT3G16910 AT2G05100 ATCG00130
02.45.03	light absorption	0.7%	0.1%	0.000519	AT2G05070 AT2G34430 AT3G47470 AT2G05100 AT1G29920
4	<b>STORAGE PROTEIN</b>	1.6%	0.2%	1.21e-06	AT4G27140 AT2G28490 AT5G54740 AT1G18980 AT4G28520 AT2G26560 AT4G16980 AT5G44120 AT1G03880 AT5G20630 AT4G27150 AT4G14630
04.01	<i>storage facilitating proteins</i>	1.6%	0.2%	1.21e-06	AT4G27140 AT2G28490 AT5G54740 AT1G18980 AT4G28520 AT2G26560 AT4G16980 AT5G44120 AT1G03880 AT5G20630 AT4G27150 AT4G14630
10	<b>CELL CYCLE AND DNA PROCESSING</b>				
10.01	<i>DNA processing</i>				
10.01.03	DNA synthesis and replication	1.1%	0.3%	0.00104	AT1G03815 AT2G21790 AT1G44900 AT2G27120 AT4G19130 AT1G67500 AT3G27060 ATCG00040
16	<b>PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT</b>				
16.09	<i>lipid binding</i>	2.3%	0.5%	1.8e-06	AT2G48140 AT4G27140 AT5G54740 AT4G12480 AT3G08770 AT5G59320 AT4G22470 AT2G38530 AT3G22620 AT3G43720 AT4G22490 AT5G59310 AT3G61190 AT4G12490 AT3G22600 AT4G27150 AT4G12470
20	<b>CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITATION AND TRANSPORT ROUTES</b>				
20.01	<i>transported compounds (substrates)</i>	10.6%	7.1%	0.000256	AT5G52760 AT5G54740 AT1G15690 ATCG00440 ATCG00470 AT5G52750 AT3G16240 AT2G25060 AT4G12490 AT5G49630 ATCG01050 AT1G69500 AT1G77210 AT3G22620 AT4G22490 AT1G09180 AT5G25090 AT4G27150 AT1G19770 AT4G04640 AT4G15760 AT4G31940 ATCG00150 AT3G26210 AT5G22140 AT2G23150 AT1G27080 AT5G50200 AT5G13490 AT5G16150 AT1G16390 AT3G11820 ATCG01010 ATCG01080 AT2G44790 AT2G332300 AT1G03850 AT2G38530 AT1G66760 ATMG00580 ATCG00130 AT1G08560 AT5G47450 AT3G62950 AT5G49730 ATCG01070 AT2G48140 AT4G12480 AT5G18600 AT5G55930 AT4G22470 AT5G01600 AT3G26220 AT4G10040 AT3G43720 AT4G03320 AT1G20350 AT4G31840 AT1G26380 AT5G40780 AT3G22600 AT4G12470 AT2G36590 AT4G27140 AT1G62570 AT5G61440 AT3G08770 AT4G28950 AT5G20230 AT4G24230 AT3G22370 AT5G57220 AT5G59310 AT3G28740 AT1G12110 AT2G31660 AT4G36670 AT1G11610 AT3G27070 AT1G20925



20.01.13	lipid/fatty acid transport	2.1%	0.5%	1.47e-06	AT2G48140 AT4G27140 AT5G54740 AT4G12480 AT2G38530 AT3G43720 AT3G22620 AT4G22490 AT3G08770 AT5G59310 AT4G22470 AT4G24230 AT4G12490 AT3G22600 AT4G27150 AT4G12470
32	<b>CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE</b>	15.4%	5.1%	3.82e-25	AT1G15690 AT3G51910 AT2G37130 AT3G23250 AT3G12580 AT5G17220 AT3G48090 AT3G09440 AT5G63310 AT4G27410 AT1G71895 AT4G12490 AT5G59780 AT5G49630 AT1G76180 AT2G37180 AT5G20720 AT5G52640 AT5G05410 AT3G45140 AT1G02930 AT4G13770 AT1G09090 AT1G54050 AT5G15970 AT1G1
32.01	<b>stress response</b>	11.3%	3%	4.71e-24	AT1G15690 AT3G51910 AT3G23250 AT3G19210 AT3G12580 AT5G47450 AT3G24500 AT5G43580 AT4G12720 AT1G71030 AT4G37260 AT3G48090 AT1G22640 AT3G09440 AT5G63310 AT4G27410 AT5G42020 AT1G71895 AT3G46230 AT5G59780 AT5G02490 AT3G30775 AT4G23400 AT5G49630 AT1G76180 AT4G35770 AT2G37180 AT5G47230 AT5G13930 AT5G20720 AT5G20630 AT5G52640 AT5G05410 AT5G01600 AT3G45140 AT2G26150 AT1G02930 AT4G13770 AT1G09090 AT1G54050 AT5G15970 AT1G19660 AT3G61190 AT2G38870 AT3G62550 AT4G02520 AT3G15500 AT4G35100 AT2G42540 AT2G39800 AT1G67500 AT5G07990 AT4G37520 AT5G20230 AT3G22370 AT1G59860 AT5G02500 AT4G37530 AT3G16460 AT5G43170 AT5G50200 AT2G31865 AT1G48130 AT1G07400 AT1G05260 AT5G27760 AT3G16770 AT5G51440 AT3G03190 AT3G12610 AT4G25200 AT1G12110 AT5G59820 AT2G29500 AT3G16450 AT3G22840 AT2G21640 AT5G19890 AT5G20850 AT5G12020 AT3G52115 AT4G25470 AT5G49480 AT4G34710 AT2G23680
32.01.01	oxidative stress response	3.1%	0.7%	4.46e-08	AT3G30775 AT3G03190 AT4G35770 AT5G13930 AT4G37520 AT5G59820 AT5G20230 AT2G29500 AT5G05410 AT5G01600 AT2G26150 AT3G12580 AT2G21640 AT4G37530 AT5G19890 AT1G02930 AT4G12720 AT3G48090 AT1G54050 AT5G63310 AT4G34710 AT1G07400 AT1G71895
32.01.03	osmotic and salt stress response	2.7%	0.8%	3.48e-06	AT4G23400 AT5G49630 AT1G15690 AT4G35100 AT2G42540 AT2G39800 AT2G37180 AT5G59820 AT3G23250 AT5G47450 AT4G12720 AT5G43170 AT1G71030 AT4G37260 AT5G15970 AT1G22640 AT5G49480 AT4G34710 AT1G05260 AT5G59780
32.01.05	heat shock response	2.8%	0.3%	1.11e-12	AT5G02490 AT5G02500 AT5G51440 AT3G24500 AT5G12020 AT1G09090 AT3G51910 AT1G54050 AT4G25200 AT3G09440 AT1G07400 AT5G59820 AT5G42020 AT3G61190 AT2G29500 AT5G52640 AT5G05410 AT1G59860 AT3G46230 AT2G26150 AT3G12580
32.01.06	cold shock response	2.4%	0.6%	1.35e-06	AT4G02520 AT1G76180 AT2G42540 AT5G47230 AT5G20720 AT5G20630 AT5G59820 AT3G22370 AT3G16450 AT5G01600 AT3G22840 AT5G02500 AT3G16460 AT4G25470 AT5G43170 AT5G15970 AT3G61190 AT1G05260
32.01.13	electromagnetic waves stress response (e.g. UV, X-ray)	0.8%	0.1%	0.000207	AT4G13770 AT5G07990 AT5G63310 AT5G20850 AT3G12610 AT1G67500

<b>32.07</b>	<b>detoxification</b>	3.1%	1%	4.38e-06	A15G61440 A14G02520 A2G37130 A11G78340 A14G37520 A11G27130 A15G17220 A4G37530 A13G62950 A14G36430 A11G48130 A11G71695 A11G17180 A11G05260 A15G18600 A11G78370 A13G03190 A12G47730 A13G61440 A11G17170 A11G03850 A15G19890 A11G02930
32.07.07	oxygen and radical detoxification	2.9%	1%	1.01e-05	A15G61440 A14G02520 A2G37130 A11G78340 A14G37520 A11G27130 A15G17220 A4G37530 A13G62950 A14G36430 A11G48130 A11G71695 A11G17180 A11G05260 A15G18600 A11G78370 A13G03190 A12G47730 A11G17170 A11G03850 A15G19890 A11G02930
32.07.07.03	glutathione conjugation reaction	1.3%	0.2%	1.05e-05	A11G27130 A15G17220 A2G47730 A11G02930 A14G02520 A11G78370 A11G78340 A13G03190 A11G17180 A11G17170
<b>34</b>	<b>INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT</b>	14.8%	5.5%	2.36e-20	A11G15690 A13G51910 A12G37130 A14G29170 A13G23250 A13G12580 A13G09440 A15G63310 A14G27410 A15G20250 A15G02810 A14G12490 A15G59780 A15G49630 A13G28930 A11G76180 A13G28210 A12G37180 A15G20270 A15G52640 A15G05410 A13G45140 A11G02930 A14G13770 A11G09090 A11G5
<b>34.11</b>	<b>cellular sensing and response to external stimulus</b>	14.5%	4.9%	6.47e-23	A11G15690 A13G51910 A12G37130 A14G29170 A13G23250 A13G12580 A13G09440 A15G63310 A14G27410 A15G20250 A15G02810 A14G12490 A15G59780 A15G49630 A13G28930 A11G76180 A13G28210 A12G37180 A15G20270 A15G52640 A15G05410 A13G45140 A11G02930 A14G13770 A11G09090 A11G5
34.11.01	photoperception and response	3.2%	0.9%	4.27e-07	A13G47340 A13G60140 A13G51910 A13G12610 A14G29170 A14G35770 A11G71030 A14G37260 A15G13930 A15G07990 A15G59820 A15G20230 A12G29500 A15G05410 A12G26150 A13G13450 A13G12580 A14G31500 A14G13770 A13G52115 A12G41100 A11G54050 A15G63310 A15G20250 A15G49730
34.11.03	chemoperception and response	8.1%	2.9%	4.01e-12	A11G15690 A13G23250 A15G47450 A13G24500 A14G12720 A11G71030 A14G37260 A11G22640 A14G27410 A15G20250 A15G59780 A15G54490 A14G23400 A15G49630 A11G76180 A14G35770 A13G28210 A12G37180 A15G13930 A15G52640 A15G05410 A15G01600 A13G45140 A11G02930 A15G15970 A11G05710 A13G61190 A13G56400 A11G54040 A13G15500 A14G35100 A13G60140 A12G32020 A12G42540 A12G39800 A13G00473 A15G44420 A13G13450 A15G43170 A15G59310 A15G50200 A11G48130 A11G05260 A15G25350 A11G13260 A12G27050 A13G16770 A13G51920 A13G47340 A15G59320 A13G12610 A15G03780 A15G01540 A11G12110 A15G59820 A15G13320 A11G03850 A15G14920 A11G74670 A15G49480 A14G34710
34.11.03.12	water response	2%	0.4%	3.33e-06	A13G24500 A11G02930 A15G49630 A13G15500 A11G15690 A15G15970 A11G76180 A11G48130 A11G12110 A14G27410 A12G39800 A12G37180 A11G05260 A15G05410 A13G45140
34.11.03.13	osmosensing and response	2.7%	0.8%	3.72e-06	A14G23400 A15G49630 A11G15690 A14G35100 A12G42540 A12G39800 A12G37180 A15G59820 A13G23250 A15G47450 A14G12720 A15G43170 A11G71030 A14G37260 A15G15970 A11G22640 A15G49480 A14G34710 A11G05260 A15G59780

34.11.09	temperature perception and response	5.2%	0.9%	1.92e-16	AT5G02490 AT5G51440 AT4G02520 AT3G51910 AT4G25200 AT1G76180 AT2G42540 AT5G047230 AT5G20720 AT5G20630 AT5G59820 AT3G22370 AT2G29500 AT5G52640 AT5G05410 AT3G16450 AT5G01600 AT1G59860 AT2G26150 AT2G40340 AT3G22840 AT3G12580 AT5G02500 AT3G24500 AT3G16460 AT5G12020 AT4G25470 AT5G43170 AT1G09090 AT2G41100 AT1G54050 AT5G15970 AT3G09440 AT1G07400 AT5G42020 AT5G02810 AT3G61190 AT1G05260 AT3G46230
34.11.10	response to biotic stimulus	2.3%	0.8%	0.000324	AT3G56400 AT4G12480 AT4G37980 AT3G28830 AT2G38470 AT2G37130 AT5G13320 AT5G52640 AT5G01600 AT5G44420 AT3G12580 AT5G02500 AT3G52430 AT4G12490 AT2G38870 AT3G11820 AT4G12470
36	<b>SYSTEMIC INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT</b>	6.1%	2.5%	8.5e-08	AT2G14810 AT3G23250 AT3G24500 AT5G43580 AT4G12720 AT1G71030 AT4G37260 AT3G48090 AT1G222640 AT4G27410 AT5G59780 AT5G54490 AT1G76180 AT4G35770 AT3G28210 AT3G28210 AT5G13930 AT3G45140 AT3G52430 AT5G15970 AT1G05710 AT3G61190 AT1G19660 AT3G28210 AT2G32020 AT2G39800 AT3G04730 AT5G44420 AT5G59310 AT5G25350 AT1G13260 AT2G27050 AT3G16770 AT5G59320 AT5G03780 AT5G01540 AT5G59820 AT5G13320 AT1G03850 AT5G47220 AT5G14920 AT1G74670 AT4G34710
36.20	<b>plant / fungal specific systemic sensing and response</b>	5.3%	2.2%	1.41e-06	AT2G14810 AT3G23250 AT3G24500 AT4G12720 AT1G71030 AT4G37260 AT3G48090 AT1G222640 AT4G27410 AT5G59780 AT5G54490 AT1G76180 AT4G35770 AT3G28210 AT5G13930 AT3G45140 AT3G52430 AT5G15970 AT1G05710 AT3G61190 AT1G19660 AT3G28210 AT2G32020 AT2G39800 AT3G04730 AT5G44420 AT5G59310 AT5G25350 AT1G13260 AT2G27050 AT3G16770 AT5G59320 AT5G03780 AT5G01540 AT5G13320 AT1G03850 AT5G47220 AT5G14920 AT1G74670 AT4G34710
36.20.18	plant hormonal regulation	4.7%	2%	1.12e-05	AT3G23250 AT3G24500 AT1G71030 AT4G37260 AT1G222640 AT4G27410 AT5G59780 AT5G54490 AT1G76180 AT4G35770 AT3G28210 AT5G13930 AT3G45140 AT5G15970 AT1G05710 AT3G61190 AT3G52430 AT5G15970 AT1G05710 AT3G61190 AT1G19660 AT3G28210 AT2G32020 AT2G39800 AT3G04730 AT5G44420 AT5G59310 AT5G25350 AT1G13260 AT2G27050 AT3G16770 AT5G59320 AT5G03780 AT5G01540 AT5G13320 AT1G03850 AT5G47220 AT5G14920 AT1G74670 AT4G34710
36.20.18.02	ethylene response	1.5%	0.4%	0.000163	AT3G16770 AT2G27050 AT3G24500 AT1G71030 AT4G37260 AT1G222640 AT1G05710 AT5G25350 AT3G23250 AT5G44420 AT5G59780
36.20.18.05	abscisic acid response	1.9%	0.6%	0.000283	AT5G59320 AT2G32020 AT1G76180 AT3G28210 AT5G01540 AT5G01540 AT2G39800 AT3G24500 AT1G71030 AT5G59310 AT4G37260 AT5G15970 AT1G222640 AT4G34710 AT4G27410
36.20.18.99	other plant signalling molecules response (jasmonic acid, salicylic acid etc.)	2.1%	0.6%	6.78e-05	AT3G56400 AT1G54040 AT5G03780 AT4G35770 AT5G13930 AT3G23250 AT3G45140 AT5G44420 AT5G14920 AT1G74670 AT1G71030 AT4G37260 AT1G222640 AT4G34710 AT3G61190 AT5G59780
36.25	<b>animal specific systemic sensing and response</b>	1.6%	0.4%	9.31e-05	AT5G43580 AT1G222640 AT5G50200 AT4G35770 AT4G34710 AT1G19660 AT5G13930 AT5G59820 AT5G20230 AT3G61190 AT3G45140 AT2G38870

36.25.16	immune response	1.6%	0.4%	5.56e-05	AT5G43580 AT1G22640 AT5G50200 AT4G35770 AT4G34710 AT1G19660 AT5G13930 AT5G59820 AT5G20230 AT3G61190 AT3G45140 AT2G38870
36.25.16.08	response to wounding	1.6%	0.3%	7.33e-06	AT5G43580 AT1G22640 AT5G50200 AT4G35770 AT4G34710 AT1G19660 AT5G13930 AT5G59820 AT5G20230 AT3G61190 AT3G45140 AT2G38870
<b>70</b>	<b>EXTRACELLULAR LOCALIZATION</b>				
<b>70.27</b>	<b>extracellular / secretion proteins</b>	1.6%	0.4%	5.09e-05	AT4G28250 AT2G14610 AT3G49780 AT2G18660 AT2G03090 AT5G67360 AT5G20630 AT4G24230 AT4G33720 AT2G40610 AT2G37640 AT4G14630
70.27.01	extracellular matrix component	1.6%	0.4%	3.52e-05	AT4G28250 AT2G14610 AT3G49780 AT2G18660 AT2G03090 AT5G67360 AT5G20630 AT4G24230 AT4G33720 AT2G40610 AT2G37640 AT4G14630

**Table S4. Comparisons of the CATMA microarray results of the IR experiment with some previous transcriptomic analysis carried on *A. thaliana* exposed to ionising radiation doses. (\*) detailed data not available. FC: Fold change (positive for up-regulation and negative for down-regulation). Reference: A - Results from this work ; B - Culligan et al. 2006. Plant J 48:947–961 ; C - Ricaud et al. 2007. PLoS ONE 2(5): e430 , D - Kim et al. 2007 Radiat Res 168:267–280 ; E - Kovalchuk et al. 2007. Mutat Res 624:101-113 ; F - Nagata et al. 2005. J Agric Food Chem 53:1022-1030. Material: (1) whole plant ; (2) Rosette leaves.**

TAIR ID	Gene name	Reference: A						Reference: B		Reference: C						Reference: D		Reference: E		Reference: F		
		Radiation: X-rays			Radiation: $\gamma$ -rays			Radiation: $\gamma$ -rays		Radiation: $\gamma$ -rays		Radiation: $\gamma$ -rays		Radiation: $\gamma$ -rays		Radiation: $\gamma$ -rays		Radiation: $\gamma$ -rays				
		10 Gy	20 Gy	40 Gy	10 Gy	20 Gy	40 Gy	2 h	26 h	10 Gy	100 Gy	0.75 h	1.5 h	3 h	5 h	54	37	1 Gy	2 kGy			
<b>Number of common regulated genes:</b>																						
<b>up 10 Gy</b>		2 h		26 h		40 Gy		100 Gy		0.75 h		1.5 h		3 h		5 h		200 Gy		1 Gy		
		FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	
AT5G66140	20S proteasome subunit alpha type-7-B (PAD2)	2,06								11,5	1,87	3,29										
AT3G22840	Early light-inducible protein ELIP1	1,67																				
AT1G032900	Probable granule-bound starch synthase 1 (MAXY)	1,56									-1,84											
AT5G05270	Chalcone-flavanone isomerase (CHI)	1,63									1,72											
AT4G01390	Meprin and TRAF homology domain-containing protein		1,57																			
AT1G66080	Unknown protein		1,59																			
AT3G23810	Adenosylhomocysteinase 2 (SAHH2)		1,60							3,1												
AT4G03210	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 9 (XTH9)		1,69																			
AT2G36870	Xyloglucan:xyloglucosyl transferase		1,71																			
AT3G12610	DNA-damage-repair/ator protein DRT100		1,59																			
AT2G26150	Heat stress transcription factor A-2 (HSFA2)		1,61																			
AT4G25470	Dehydration-responsive element-binding protein 1C (DREB1C)		1,76																			
AT4G29780	Unknown protein		1,61																			
AT2G22500	Mitochondrial dicarboxylate carrier 1		1,66																			
AT1G054040	Epithiospecific protein ESP		1,82																			
AT5G15970	Stress-induced protein KIN2		2,20																			
AT5G42020	Heat shock 70 kDa protein 12 (HSP70-11)		1,56																			
AT5G35090	Unknown protein		1,62																			
AT4G39800	Inositol-3-phosphate synthase isozyme 1		2,07																			
AT1G11850	Unknown protein		1,60																			
AT1G78370	Glutathione-S-transferase GSTU20		1,62																			
AT2G16280	3-ketoacyl-CoA synthase 9 (KCS9)		1,57																			
AT4G24510	HXXXD-type acyl-transferase-like protein (cer2)		1,62																			
<b>up 40 Gy</b>		2 h		26 h		40 Gy		100 Gy		0.75 h		1.5 h		3 h		5 h		200 Gy		1 Gy		
AT3G15430	Regulator of chromosome condensation RCC1		1,57																			
AT3G27010	Transcription factor TCP20		1,58																			











AT5G20850	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51)	3,19	9,50	186,5	13,47	9,74	2,14	2,14			up
AT2G30360	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 11 (CIPK11)	3,26	6,68	11,1	4,07	4,18			2,46	2,46	up
AT5G48720	X-ray induced gene 1 (XRI1)	3,62	9,45	285,2	9,08	4,99	1,61	2,02	2,46		
AT3G45730	Unknown protein	5,22	13,40	46,3							
AT5G07610	F-box family protein	2,17	5,72		4,97	1,81	2,91	2,00			
AT5G43630	CCHC-type zinc knuckle protein	1,59	2,02			1,93					
AT3G08770	Non-specific lipid-transfer protein 6 (LTP6)										
AT4G29020	Glycine-rich protein	1,61	1,61	1,61	1,80						
AT5G20720	20 kDa chaperonin, chloroplastic (CPN21)	1,59	1,74		-1,79						
AT3G16370	GDSL esterase/lipase APG	1,61	1,58		2,03	3,05	2,68				
AT1G04800	Glycine-rich protein	1,61	1,67			2,06					
AT5G63310	Nucleoside diphosphate kinase II, chloroplastic (NDPK2)	1,66	1,63		3,44				2,14		
AT4G27652	Unknown protein	1,62	1,59	-4,6							
AT2G28950	Expansin-A6 (EXPA6)	2,01	1,63	-2,7	3,17		3,36				
AT4G39330	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 9 (CAD9)	2,06	1,84		2,68		2,44				
AT2G21790	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (RMR1)	1,84	3,60	13,7	2,49	5,11	1,87		3,25	3,25	
AT5G60250	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	2,70	5,43	34,9		1,95			4,00	4,00	
AT3G07800	Thymidine kinase	4,02	12,51	46,2							
AT5G49480	Calcium binding protein CP1	4,29	8,46	15,1					2,14	2,14	up
AT3G27630	Unknown protein	4,06	13,50		3,48	4,30	2,02				
AT3G56270	Meprin and TRAF homology domain-containing protein	3,54	6,57		6,82	14,27	3,09				
AT2G18193	A.AA-type ATPase family protein	10,06	36,63	216	5,53	11,20	2,38	3,40			
AT3G27060	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain C (TSO2)	6,40	15,49	276	20,77	39,58	6,44	10,50			
<b>down 10 Gy</b>											
AT4G27280	EF hand calcium binding protein	-2,08		-4,9						5,66	
AT2G24550	Unknown protein	-1,70		3	2,39	1,89	1,99				
AT1G80850	Methyladenine glycosylase family protein	-1,76		3,9							
AT5G61600	Ethylene-responsive transcription factor ERF104	-2,31		-4,7							
AT5G47230	Ethylene-responsive transcription factor ERF5	-1,83		-3,9							
AT3G55980	Zinc finger CCH domain-containing protein 47	-1,72									up
AT5G59820	Zinc finger protein ZAT12	-1,71		-2,7							up
AT5G51190	Ethylene-responsive transcription factor ERF105	-1,69		-4,8							
AT4G17500	Ethylene-responsive transcription factor ERF1A	-1,64									up
AT1G09070	Soybean gene regulated by cold SRC2	-1,66									up
AT3G61190	BON1-associated protein 1 (BAP1)	-1,67								2,46	
AT1G19770	Probable purine permease 14 (PUP14)	-1,65				1,61					







AT5G22920	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-2,49	-3,04	-3,49	-1,70	-2,47	-1,58			
AT1G80440	F-box/kelch-repeat protein	-5,14	-3,14	-3,75	-1,97	-3,08		2,08		
AT5G49450	Transcription factor-like protein bZIP1	-2,06	-2,76	-2,01	-1,63	-1,74				
AT4G32480	Unknown protein	-2,24	-2,24	-2,54	-1,64	-2,98	-1,71	-1,74		
AT4G36040	Chaperone protein DnaJ 11 (AtJ11)	-2,27	-2,34	-1,79	-1,70	-2,03	-2,19	-1,63		
AT1G28330	Dormancy-associated protein-like 1 (DYLL1)	-3,00	-2,49	-2,83	-2,20		1,98	1,70		
AT2G33830	Dormancy/auxin associated protein	-2,84	-2,58	-2,63	-2,15		3,06	2,47		
<b>Opposite 10Gy vs 40 Gy</b>										
AT5G23820	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	1,65	-1,72						8,57	
AT4G13770	Cytochrome P450 CYP83A1	1,80	-1,69			1,71	2,43			up
AT2G38470	Transcription factor WRKY33	-1,62	1,61						-2,83	
AT4G15610	CASP-like protein	-2,01	1,61	-1,59						
<b>oscillantes 10 Gy</b>										
AT3G44260	Probable CCR4-associated factor 1 homolog 9 (CAF1-9)	-1,68	1,59							up
AT4G37990	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 8 (CAD8)	1,59	-1,61							up
<b>oscillante 40 Gy</b>										
AT5G59870	Probable histone H2A.7			-1,72	1,74				4,00	
AT5G10390	Histone H3.2 (HTR13)			-1,68	1,79		-2,41	-1,74	4,29	
AT2G28000	Chaperonin 60 subunit alpha 1, chloroplastic (CPN60A1)	1,71	-1,65	1,60		4,12	1,66	6,38		

Table S5. Genes both regulated in the transcriptomic and in the proteomic approach [15] after IR exposure. The given positive and negative values are respectively the fold up- or down-regulation compared to the control. Bold: statistically significant regulation; rep: spot disappearance compared to the control 0 Gy; ind: spot appearance compared to the control 0 Gy; \*protein identified in several spots in the proteomic approach; \*\* protein regulated only in the root proteomic analysis; §: non available data.

TAIR ID	Name	Transcriptomic CATMA analysis						Proteomic 2-DE analysis					
		10 Gy			40 Gy			10 Gy			40 Gy		
		2 h	26 h	2 h	26 h	2 h	26 h	2 h	24 h	72 h	2 h	24 h	72 h
AT4G38970	Fructose biphosphate aldolase FBA2 *	1.06	1.41	-1.40	<b>1.60</b>	-1.45	-1.57	-1.97	-1.99	<b>4.82</b>	5.94	-2.51	
AT5G24490	30S ribosomal protein, putative *	-1.6	-1.71	-1.59	-1.46	-4.32	1	184.82	1.38	ind	274.37	11.63	
AT4G04640	ATP synthase gamma chain 1, chloroplastic (ATPC1) *	1.02	1.38	-1.43	<b>1.74</b>	-3.07	-70.03	ind	3.46	-1.59	2.99	-1.28	
AT1G52100	Jacalin-like lectin domain-containing protein	-1.01	1.06	-1.78	-1.1	-1.04	1.27	-1.14	-4.08	-4.29	-1.55	-2.08	
AT3G01500	Carbonic anhydrase CA1	§	1.43	1.44	<b>1.71</b>	1.72	-2.81	-2.06	-8.17	-2.68	-2.57	-1.6	
AT5G19550	Aspartate transaminase, cytoplasmic isozyme 1 (ASP2)	1.28	-1.03	<b>1.99</b>	1.19	-1.1	1.62	-6.92	rep	-12.21	-1.68	-1.68	
ATCG00540	Apocytochrome f (petA)	<b>1.64</b>	-1.27	1.37	-1.65	1.01	1.29	-2.33	-144.01	-19.7	-1.68	-1.68	
AT5G20720	20 kDa chaperonin, chloroplastic (CPN21)	1.24	<b>1.59</b>	-1.25	<b>1.74</b>	-1.53	-1.53	-1.53	-1.83	-1.83	-1.83	-1.83	
AT3G09440	Heat shock 70 kDa protein 3 (HSP70-3)**	1.39	1.04	<b>2.01</b>	1.09	-1.92	-1.92	-1.92	1.6	1.6	1.6	1.6	

**Table S6. ATM-regulated genes which were induced after 40 Gy X-ray irradiation in the CATMA transcriptomic analysis and corresponding fold changes after 10 Gy and 40 Gy. Fold changes of these genes after 100 Gy  $\gamma$ -irradiation are given from Culligan *et al.* 2006 (1) and from Ricaud *et al.* 2007 (2); \*Co-expressed genes present in our dataset, given by PosMed website (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>) over a thousand GeneChip data in *A. thaliana*. atm: ATM knockout mutant; NC: no change; ■ significant change, meaning 1.56 FC in Gicquel *et al.* 2012, 1.9 FC in Culligan *et al.* 2006 and 1.57 FC in Ricaud *et al.* 2007; ■ significant change but clearly inhibited then in the wild type.**

TAIR ID	Gene name	10 Gy 2 h	40 Gy 2 h	(1) 100 Gy 1.5 h	(1) 100 Gy 1.5 h	(2) 100 Gy 0.75 h	(2) 100 Gy 1.5 h	(2) 100 Gy 3 h	(2) 100 Gy 5 h	(2) 100 Gy atm 0.75 h	(2) 100 Gy atm 1.5 h	(2) 100 Gy atm 3 h	(2) 100 Gy atm 5 h
<b>DNA-repair genes</b>													
AT5G20850	DNA repair protein homolog 1 (RAD51)	3.19	9.5	186.5	2.6	13.5	9.7	1.4	2.1	1.9	1.7	1.2	1.6
AT4G29170	Meiotic nuclear division protein 1 homolog (MND1)	1.5	3.35	40.7	1.3	1.5	1.7	1.1	1.1	-1.4	-1.1	1.2	1.1
AT1G13330	Homologous-pairing protein 2 homolog AHP2 (HOP2)	1.2	1.98	17.3	-1.4	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AT5G40840	Sister chromatid cohesion protein 2 (SYN2 / ATRAD21.1)	1.4	2.42	113.9	2	2.7	1.3	1.0	1.1	1.1	-1.0	1.0	1.4
AT5G48720	X-ray induced gene 1 (XR1)	3.62	9.45	285.2	2.1	9.1	5.0	1.6	2.0	1.8	1.7	1.3	1.9
AT5G66130	Cell cycle checkpoint protein RAD17	1.74	3.16	30.4	1.3	4.3	2.9	1.2	1.5	1.1	-1.0	1.2	1.3
AT1G09815	DNA polymerase delta subunit 4 (POLD4)	2.85	6.24	19.8	1.2	4.3	8.5	1.9	2.7	1.2	1.9	2.4	1.8
AT4G19130	Replication factor RFA1	1.69	2.9	59	1.3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AT3G07800	Thymidine kinase	4.02	12.51	46.2	2.3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AT5G66360	Histone H3.2 (HTR1)	1.3	2.19	5.9	1.1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AT3G15430	Regulator of chromosome condensation RCC1	1.1	1.57	2.3	1.1	1.7	1.6	1.4	1.2	1.2	-1.1	-1.0	1.1
AT2G21790	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (RNRL1)	1.84	3.6	13.7	1.1	2.5	5.1	1.3	1.9	1.2	1.6	1.9	1.8
AT3G27060	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain C (TSO2)	6.4	15.49	37.4	2.7	14.4	18.5	5.2	5.1	2.1	4.0	4.7	3.7
AT4G37490	Cyclin CYCB1;1	1.72	4.28	133.9	1.3	1.8	2.7	1.1	1.1	1.3	1.2	1.2	1.5



TAIR ID	Gene name	Co-expressed genes*
<b>DNA-repair genes</b>		
AT5G20850	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51)	Cell cycle checkpoint protein RAD17, Sister chromatid cohesion 1 protein 2 (SYN2 / ATRAD21.1), Meiotic nuclear division protein 1 homolog (MND1), Homologous-pairing protein 2 homolog AHP2 (HOP2), Protein TRF-like 10 (TRFL10), FHA domain-containing protein AT2G45460, Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein AT5G60250, Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain C (TSO2), Thymidine kinase AT3G07800, Replication factor A1, unknown AT5G02220
AT4G29170	Meiotic nuclear division protein 1 homolog (MND1)	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51), Homologous-pairing protein 2 homolog AHP2 (HOP2), Sister chromatid cohesion 1 protein 2 (SYN2 / ATRAD21.1), Cyclin CYCB1;1, DNA polymerase delta subunit 4 (POLD4), ATP binding microtubule motor family protein AT5G23910
AT1G13330	Homologous-pairing protein 2 homolog AHP2 (HOP2)	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51), Meiotic nuclear division protein 1 homolog (MND1), Protein TRF-like 10 (TRFL10), Cyclin CYCB1;1, Replication factor A1, DNA polymerase delta subunit 4 (POLD4), Zinc finger CCCH domain-containing protein 31, FHA domain-containing protein AT2G45460
AT5G40840	Sister chromatid cohesion 1 protein 2 (SYN2 / ATRAD21.1)	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51), Meiotic nuclear division protein 1 homolog (MND1), Senescence-associated protein DUF581, X-ray induced gene 1 (XRI1), unknown AT3G20490
AT5G48720	X-ray induced gene 1 (XRI1)	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51), Homologous-pairing protein 2 homolog AHP2 (HOP2), Sister chromatid cohesion 1 protein 2 (SYN2 / ATRAD21.1), Protein TRF-like 10 (TRFL10), DNA polymerase delta subunit 4 (POLD4), Thymidine kinase AT3G07800, Replication factor A1, FHA domain-containing protein AT2G45460, CCHC-type zinc knuckle protein AT3G42860
AT5G66130	Cell cycle checkpoint protein RAD17	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51), Protein TRF-like 10 (TRFL10), FHA domain-containing protein AT2G45460, Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein AT5G60250
AT1G09815	DNA polymerase delta subunit 4 (POLD4)	Meiotic nuclear division protein 1 homolog (MND1), Homologous-pairing protein 2 homolog AHP2 (HOP2), FHA domain-containing protein AT2G45460, X-ray induced gene 1 (XRI1)
AT4G19130	Replication factor RFA1	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51), Homologous-pairing protein 2 homolog AHP2 (HOP2), Protein TRF-like 10 (TRFL10), Thymidine kinase AT3G07800, X-ray induced gene 1 (XRI1)
AT3G07800	Thymidine kinase	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51), Protein TRF-like 10 (TRFL10), Replication factor A1, Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain C (TSO2), X-ray induced gene 1 (XRI1)
AT5G65360	Histone H3.2 (HTR1)	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (RNRF1)
AT3G15430	Regulator of chromosome condensation RCC1	None
AT2G21790	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (RNRF1)	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain C (TSO2)
AT3G27060	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain C (TSO2)	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51), Thymidine kinase AT3G07800, Cyclin CYCB1;1, Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (RNRF1)
AT4G37490	Cyclin CYCB1;1	Meiotic nuclear division protein 1 homolog (MND1), Homologous-pairing protein 2 homolog AHP2 (HOP2), Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain C (TSO2), Rac-like GTP-binding protein ARACT7, ATP binding microtubule motor family protein AT5G23910

AT3G52115	Protein gamma response 1 (GR1)	1.34	2.17	NC	NC	2.1	1.7	1	1.1	1	1	-1.1	-1
AT3G07810	RNA recognition motif-containing protein	1.30	1.68	2.5	1.0	7.2	1.6	1	1.1	-1.4	1.7	-3.1	-1.2
AT3G53230	Cell division control protein 48 homolog D (CDC48D)	1.22	1.79	2	1.2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AT5G51740	Peptidase M48 family protein	1.24	2.03	6.9	-1.1	1.4	2.1	1.0	1.2	1.3	-1	1.0	1.2
AT5G11460	Senescence-associated protein DUF581	1.49	2.85	41.6	2.1	2.7	2.6	1.1	1.5	-1.6	-1	1.1	1.4
AT5G23910	ATP binding microtubule motor family protein	1.60	2.80	64.2	1.1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AT2G47680	Zinc finger CCH domain-containing protein 31	1.68	3.42	50.8	1.3	1.5	4.2	1.3	1.5	1.5	1.5	1.6	2.0
AT2G46610	Arginine/serine-rich splicing factor, putative	1.35	2.44	19.9	1.4	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AT3G28210	Zinc finger AN1 domain-containing stress-associated	1.34	3.34	5.9	-1.2	1.7	2.6	-1.1	1.3	1.2	-1.2	1.0	1.4
AT2G38340	Dehydration-responsive element-binding protein 2E (DREB2E)	1.09	2.80	13.9	1.2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AT2G18600	Probable NEDD8-conjugating enzyme Ubc12-like (RCE2)	1.33	1.82	21.5	1.1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AT1G20350	Mitochondrial inner membrane translocase ATT1M17-1	1.0	2.73	21.2	2.1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AT4G34510	3-Ketoacyl-CoA synthase 2 (KCS2)	1.23	2.01	223.0	1.2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
AT3G13235	DNA damage-inducible protein 1	1.32	2.03	7.0	1.1	2.1	1.9	1.5	1.3	1.0	1.3	-1.3	1.2
<b>40 Gy induced genes which are ATM-regulated and frequently co-expressed* with the DNA-repair genes</b>													
AT5G03780	Protein TRF-like 10 (TRFL10)	2.39	5.07	108.3	1.5	6.3	2.4	1.5	2.0	-1.1	1.4	1.1	1.8
AT2G45460	FHA domain-containing protein	2.96	6.46	45.7	-1.2	14.4	6.4	1.8	1.1	1.1	1.1	1.3	1.0
AT5G60250	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	2.7	5.43	34.9	1.2	1.4	1.9	1.2	1.3	-1.1	-1.0	-1.1	-1.0

AT3G52115	Protein gamma response 1 (GR1)	None	None
AT3G07810	RNA recognition motif-containing protein	None	None
AT3G53230	Cell division control protein 48 homolog D (CDC48D)	Heat shock 70 kDa protein 4 (HSP70-4), Heat shock protein 90-1 (HSP90-1), Peptidase M48 family protein AT5G51740	
AT5G51740	Peptidase M48 family protein	Protein TIC 20-IV chloroplastic, Cell division control protein 48 homolog D (CDC48D), Dehydration-responsive element-binding protein 2E (DREB2E), Unknown protein AT1G07500	
AT5G11460	Senescence-associated protein DUF581	Sister chromatid cohesion 1 protein 2 (SYN2 / ATRAD21.1)	
AT5G23910	ATP binding microtubule motor family protein	Meiotic nuclear division protein 1 homolog (MND1), Cyclin CYCB1;1, Rac-like GTP-binding protein ARAC7	
AT2G47680	Zinc finger CCH domain-containing protein 31	Homologous-pairing protein 2 homolog AHP2 (HOP2), Meiotic nuclear division protein 1 homolog (MND1)	
AT2G46610	Arginine/serine-rich splicing factor, putative	Protein TRF-like 10 (TRFL10), FHA domain-containing protein AT2G45460	
AT3G28210	Zinc finger AN1 domain-containing stress-associated	Unknown protein AT4G39670	
AT2G38340	Dehydration-responsive element-binding protein 2E (DREB2E)	Peptidase M48 family protein, Unknown protein AT1G07500	
AT2G18600	Probable NEDD8-conjugating enzyme Ubc12-like (RCE2)	None	
AT1G20350	Mitochondrial inner membrane translocase ATIM17-1	None	
AT4G34510	3-Ketoacyl-CoA synthase 2 (KCS2)	None	
AT3G13235	DNA damage-inducible protein 1	None	
<b>40 Gy induced genes which are ATM-regulated and frequently co-expressed* with the DNA-repair genes</b>			
AT5G03780	Protein TRF-like 10 (TRFL10)	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51), Cell cycle checkpoint protein RAD17, Replication factor A1, Thymidine kinase AT3G07800, FHA domain-containing protein AT2G45460, Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein AT5G60250, X-ray induced gene 1 (XR1)	
AT2G45460	FHA domain-containing protein	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51), Cell cycle checkpoint protein RAD17, Homologous-pairing protein 2 homolog AHP2 (HOP2), Protein TRF-like 10 (TRFL10), DNA polymerase delta subunit 4 (POLD4), Arginine/serine-rich splicing factor putative AT2G46610, X-ray induced gene 1 (XR1)	
AT5G60250	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51), Cell cycle checkpoint protein RAD17, Protein TRF-like 10 (TRFL10), Secretion-associated RAS 1 protein SARTB putative, Probable NEDD8-conjugating enzyme Ubc12-like (RCE2), unknown AT4G25330, unknown AT4G22960	

Annexe n° 3 : Figures correspondant aux expériences d'apports exogènes en sinigrine, AITC et I3C sur *Arabidopsis thaliana*, écotype Ler.

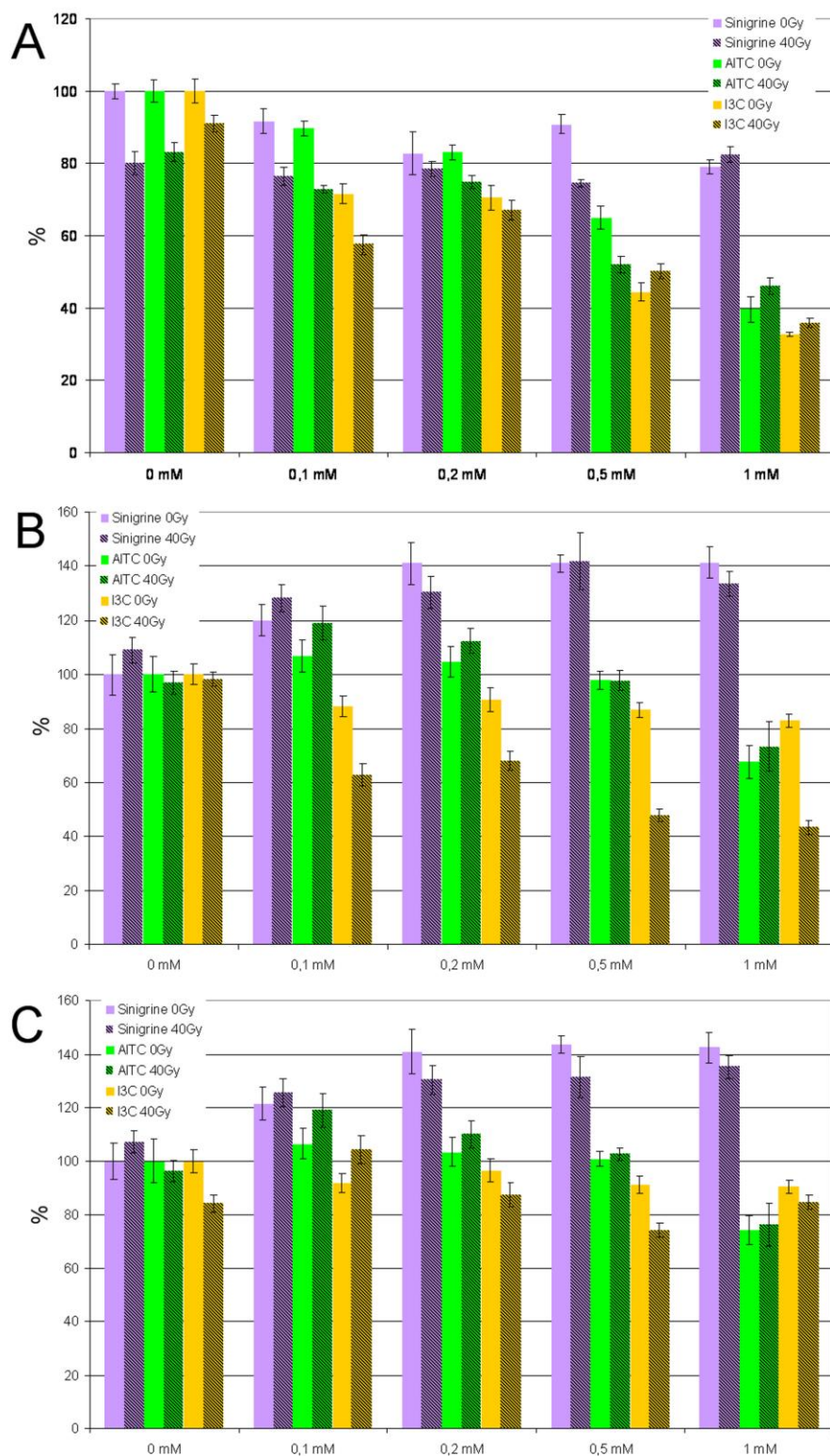


Figure 45 – Masse sèche par plante (A), teneurs en chlorophylles (B) et teneurs en caroténoïdes (C), dix jours après irradiation à la dose 40 Gy, en fonction de l'apport en Sinigrine, AITC et I3C chez *A. thaliana* écotype Ler. Les masses sont mesurées en mg / plante, les teneurs en pigment en  $\mu\text{g} / \text{mg}$  de MS et sont ensuite exprimées en pourcentage par rapport au contrôle non irradié sur milieu non complété (0 Gy, 0 mM). Les statistiques relatives à ces graphiques sont présentées dans le Tableau 17.

Tableau 17 – Statistiques relatives aux marqueurs étudiés chez *A. thaliana*, écotype *Ler* lors des expériences d'apports exogènes en sinigrine, AITC et I3C (Figures 45). Les lettres correspondent au classement des moyennes de Tukey après un test Anova significatif entre les concentrations en sinigrine pour une même condition d'irradiation (0 Gy ou 40 Gy). \* : significativement différent du témoin 0 mM pour une même condition d'irradiation (cf M&M – 9.) ; ns : aucun effet significatif ; irr : irradiation.

	Molécule	Irr (Gy)	0 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM
MS	Sinigrine	0	a	ab	b *	ab *	b *
		40	ns	ns	ns	ns	ns
	AITC	0	a	ab *	b *	c *	d *
		40	a	a *	a	b *	b *
	I3C	0	a	b *	b *	c *	c *
		40	a	bc *	b *	c *	d *
Racines	Sinigrine	0	a	b *	c *	d *	e *
		40	a	b *	c *	d *	e *
	AITC	0	\$	\$	\$	\$	\$
		40	\$	\$	\$	\$	\$
	I3C	0	\$	\$	\$	\$	\$
		40	\$	\$	\$	\$	\$
Chlorophylles	Sinigrine	0	a	ab	b *	b *	b *
		40	a	ab *	ab *	b *	b *
	AITC	0	b	a	ab	ab	c *
		40	bc	a *	b *	bc	c *
	I3C	0	a	ab *	ab	ab *	b *
		40	b	a *	bc	bc *	c *
Caroténoïdes	Sinigrine	0	a	ab *	b *	b *	b *
		40	a	ab *	b *	b *	b *
	AITC	0	ab	a	a	ab	b *
		40	bc	a *	ab *	abc	c *
	I3C	0	ns	ns	ns	ns	ns
		40	b	a *	b	b *	b

Annexe n° 4 : Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* au 11<sup>ème</sup> jour de culture en fonction de l'irradiation et de la concentration du milieu en différentes molécules (glucosinolates, molécules antioxydantes ou pro-oxydantes).

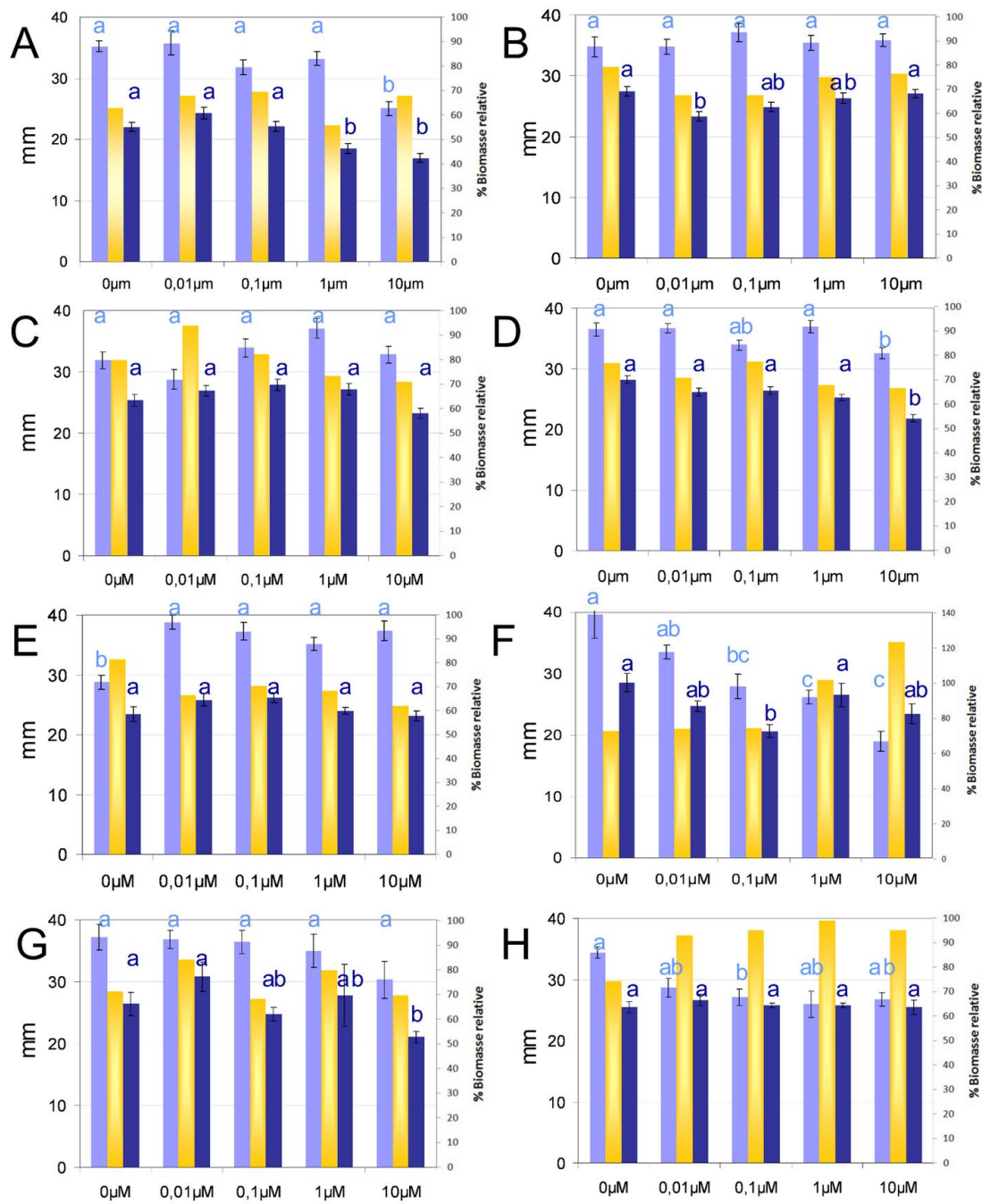


Figure 46 – Longueurs racinaires des plantules d'*A. thaliana* au 11<sup>ème</sup> jour de culture en fonction de l'irradiation et de la concentration du milieu en différentes molécules (glucosinolates, molécules antioxydantes ou pro-oxydantes). Légende : ● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative. (A) ascorbate ; (B) tanécan ; (C) : CuCl<sub>2</sub> ; (D) singrine ; (E) glucoraphanine ; (F) glucotropaeoline ; (G) glucoibérine ; (H) progointrine ; non déterminé pour le glutathion. Les lettres correspondent au classement des moyennes de Tukey après un test Anova significatif entre les concentrations en molécules (cf M&M – 9.).

**Annexe n° 5 : Tests de significativité de l'interaction entre l'effet de l'apport de molécule dans le milieu (glucosinolates, antioxydants ou pro-oxydants) et l'effet d'une irradiation à la dose 40 Gy sur la croissance racinaire d'*A. thaliana* écotype Col-0.**

**Tableau 18 – Résultats des tests anovas à 2 facteurs (apport en molécule x irradiation) pour les expériences d'apports exogènes sur *A. thaliana*. Nd = non déterminée ; ns = non significatif.**

<b>p-value de l'anova à 2 facteurs</b>	<b>11<sup>ème</sup> jour de culture</b>	<b>14<sup>ème</sup> jour de culture</b>	<b>Effet de l'interaction</b>
Ascorbate	<b>0.0221</b>	<b>0.0354</b>	Inhibition RI / ascorbate 10 µM < inhibition RI + inhibition ascorbate
Glutathion	Nd	0.1007	ns
Tanacan	0.1496	0.0946	ns
CuCl <sub>2</sub>	0.1562	0.1491	ns
Sinigrine	<b>0.0485</b>	<b>0.0042</b>	Inhibition RI / sinigrine 10 µM > inhibition RI + inhibition sinigrine 10 µM
Glucoraphanine	<b>0.0056</b>	<b>0.0035</b>	L'effet positif de la glucoraphanine atténue l'effet négatif des radiations
Glucotropaéoline	<b>0.0002</b>	<b>0.0002</b>	Inhibition RI / glucotropaéoline < inhibition RI + inhibition glucotropaéoline
Glucoibérine	0.2158	<b>0.0016</b>	La glucoibérine (ns seule) aggrave l'effet de l'irradiation
Progoïtrine	<b>0.0057</b>	<b>0.0034</b>	Inhibition RI / progoïtrine < inhibition RI + inhibition progoïtrine

Annexe n° 6 : Figures correspondant aux expériences d'apports exogènes de molécules sur *Pisum sativum* et *Allium cepa*.

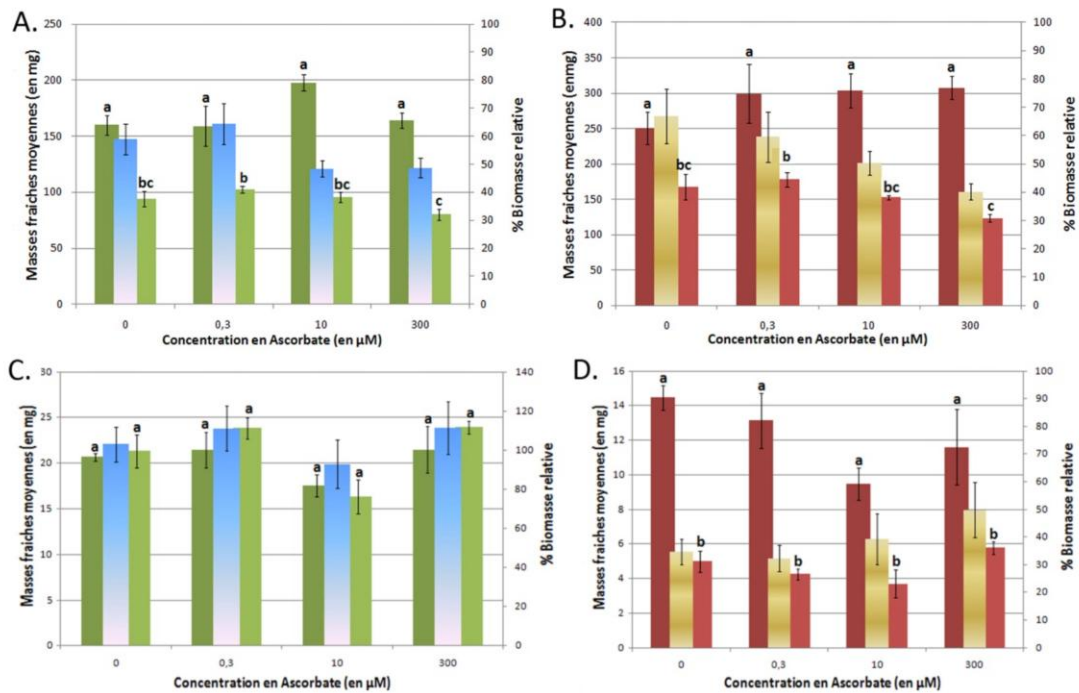


Figure 47 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) et des racines (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) en fonction de la concentration en ascorbate du milieu de culture. A et B : *Pisum sativum* ; C et D : *Allium cepa*. CT = contrôle ; Ir = irradiation.

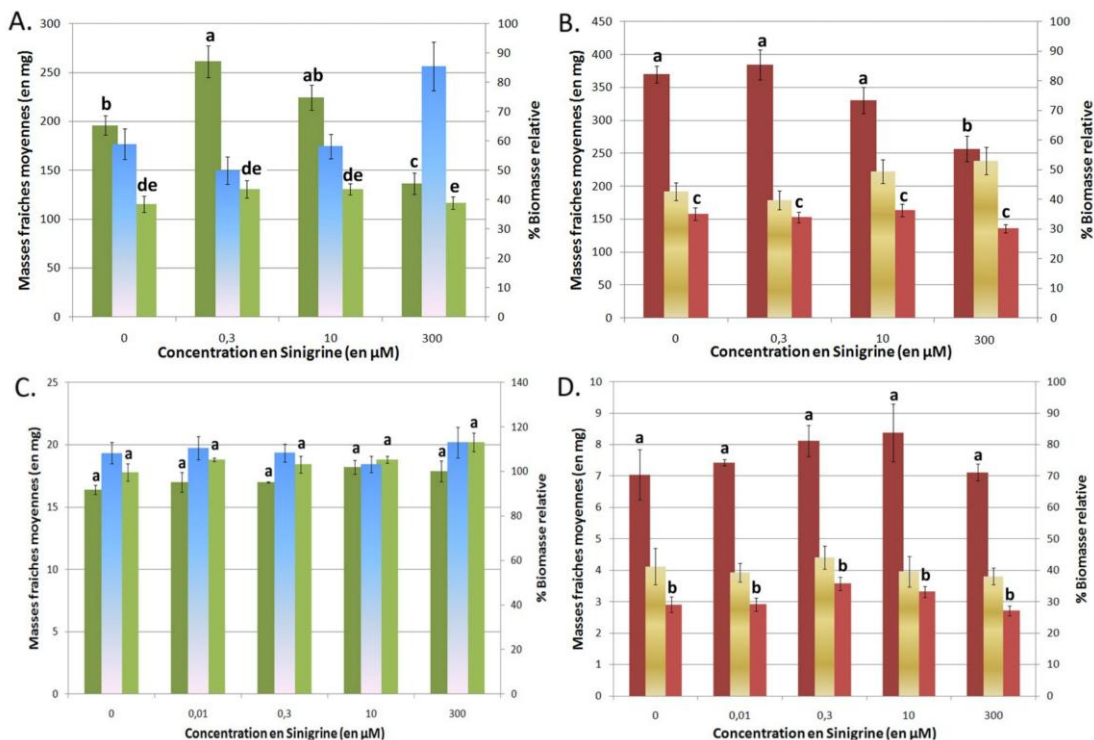


Figure 48 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) et des racines (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) en fonction de la concentration en sinigrine du milieu de culture. A et B : *Pisum sativum* ; C et D : *Allium cepa*. CT = contrôle ; Ir = irradiation.



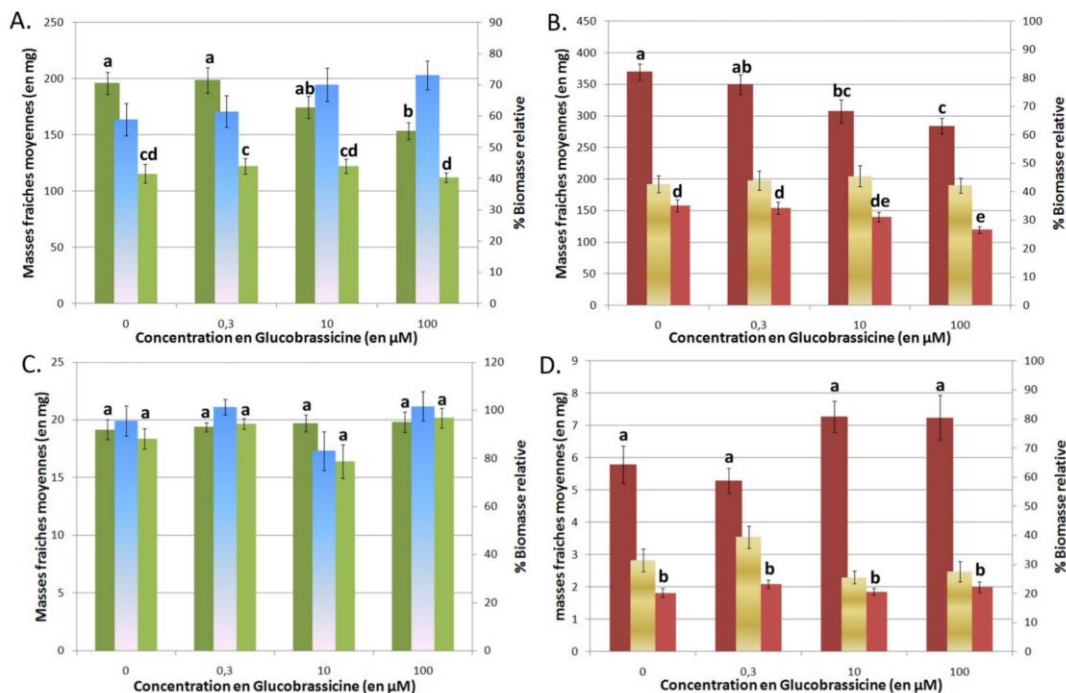


Figure 49 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) et des racines (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) en fonction de la concentration en glucobrassicine du milieu de culture. A et B : *Pisum sativum* ; C et D : *Allium cepa*. CT = contrôle ; Ir = irradiation.

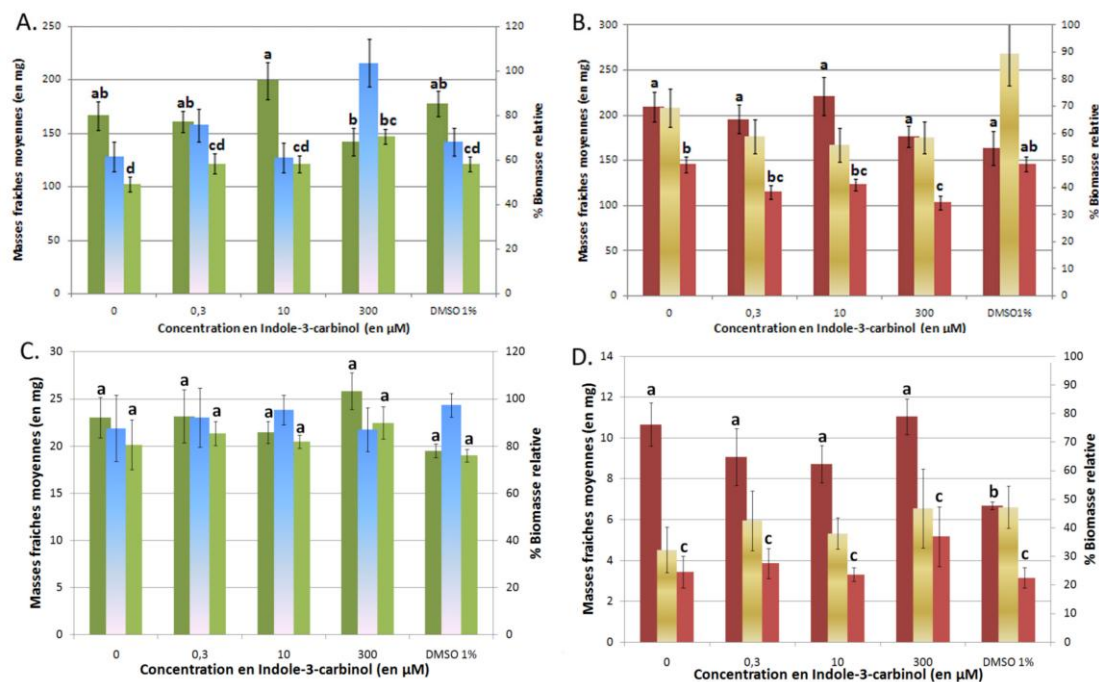


Figure 50 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) et des racines (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) en fonction de la concentration en indole-3-carbinol du milieu de culture. A et B : *Pisum sativum* ; C et D : *Allium cepa*. CT = contrôle ; Ir = irradiation.

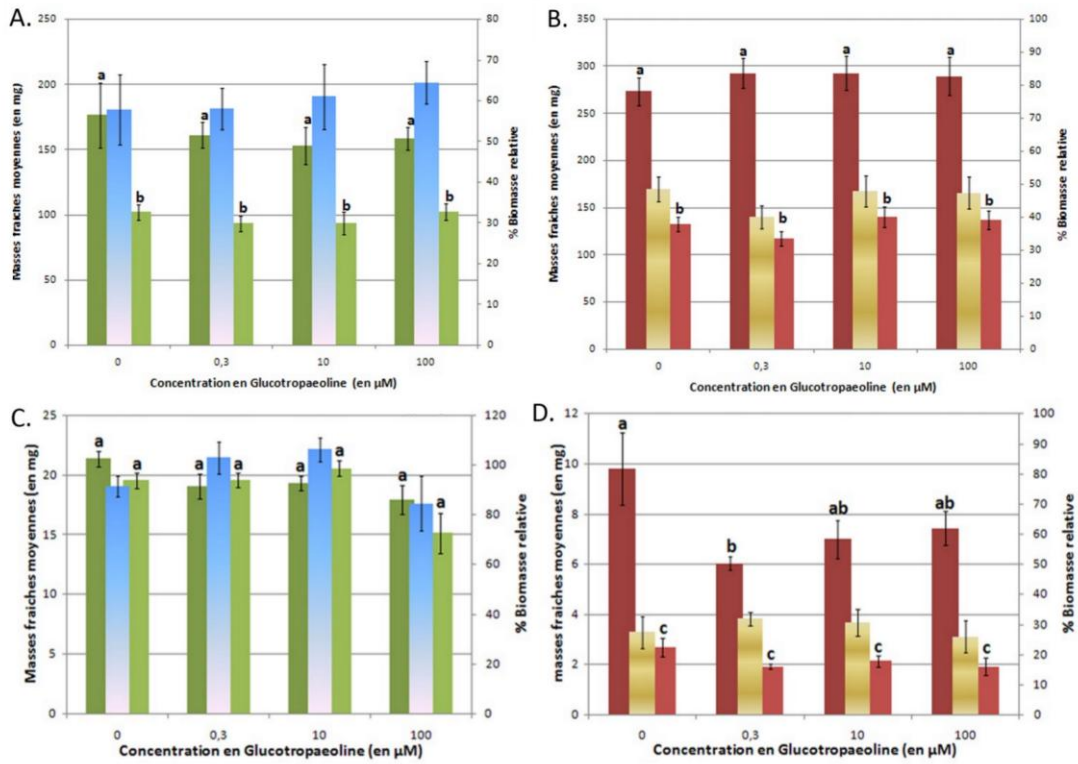


Figure 51 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) et des racines (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) en fonction de la concentration en glucotropaeoline du milieu de culture. A et B : *Pisum sativum* ; C et D : *Allium cepa*. CT = contrôle ; Ir = irradiation.

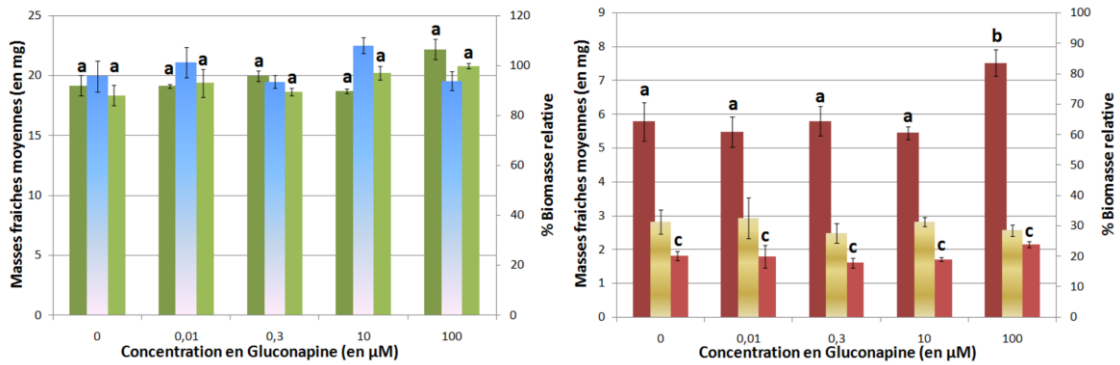


Figure 52 – Masses fraîches moyennes des parties aériennes (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) et des racines (● : CT ; ● : Ir ; ● : % biomasse relative) en fonction de la concentration en gluconapine du milieu de culture chez *Allium cepa*. CT = contrôle ; Ir = irradiation.

**Annexe n° 7 : Teneurs en familles de glucosinolates et en certains glucosinolates particuliers dans les feuilles de plantules de trois semaines et dans les graines de certains écotypes naturels d'*A. thaliana* mesurés par Kliebenstein *et al.* 2001a<sup>7</sup>.**

**Tableau 19 – Teneurs en familles de glucosinolates ( $\mu\text{mole.g de MS}^{-1}$ ) dans les feuilles de plantules de trois semaines et dans les graines de certains écotypes naturels d'*A. thaliana* mesurés par Kliebenstein *et al.* 2001a. GLSs = glucosinolates.**

	GLSs totaux	Indoliques	Aliphatiques	Méthylthioalkyl	Méthylsulfinyl	Alkényl/hydroxy aliphatiques
<b>Feuilles</b>						
Col-0	11,53	0,83	7,7	1,19	6,48	0,03
Mt-0	9,87	4,16	5,71	0,45	5,26	0
Lip-0	10,1	2,83	7,27	0,33	1,8	5,14
No-0	11,53	2,3	9,23	0,68	1,33	7,22
Ler	13,89	2,88	11,01	0,36	1,58	9,07
Di-1	11,58	3,86	7,69	0,76	5,14	1,79
Pi-0	4,27	1,44	2,83	0	0,76	2,07
Cvi-0	39,48	1,67	37,81	0,47	2,62	34,72
Hodja	16,03	1,81	14,22	0,33	0,61	13,28
Tsu	11,26	3,46	7,8	0,7	1,89	5,21
<b>Graines</b>						
Col-0	34,84	0,86	33,87	24,13	5,44	2,89
Mt-0	24,23	0,58	23,61	17,11	3,51	1,8
Lip-0	17,11	0,16	16,86	9,62	2,06	3,26
No-0	34,93	0,29	34,55	13,98	3,91	14,1
Ler	25,11	0,09	24,93	11,44	3,49	7,98
Di-1	31,76	0,25	31,37	22,77	6,74	1,05
Pi-0	18,26	0,85	17,3	9,82	2,38	3,24
Cvi-0	26,4	0,13	26,21	15,83	4,85	4,76
Hodja	27,99	0,69	27,26	11,53	4,13	10
Tsu	38,58	0,32	38,26	23,62	9,54	3,95

**Tableau 20 – Teneurs en certains glucosinolates ( $\mu\text{mole.g de MS}^{-1}$ ) particuliers dans les feuilles de plantules de trois semaines et dans les graines de certains écotypes naturels d'*A. thaliana* mesurés par Kliebenstein *et al.* 2001a.**

	sinigrine	glucoraphanine	gluconapine	progoïtrine	glucobrassicine	glucoibérine	glucotropaeoline
<b>Feuilles</b>							
Col-0	0,03	4,96	0	0	2,88	0,37	0
Mt-0	0	3,98	0	0	2,81	0	0
Lip-0	0	0	0	0	1,73	0,68	0
No-0	0	0,08	0	0	1,77	0,34	0
Ler	0	0,02	0	0	1,94	0,17	0
Di-1	0	3,62	0	0	2,82	0,03	0,03
Pi-0	0	0,08	0	0	0,93	0	0
Cvi-0	10,03	0	24,4	0	1,08	0	0
Hodja	13,1	0	0,18	0	1,16	0	0
Tsu	0	0,05	0,02	0	2,77	0,62	0
<b>Graines</b>							
Col-0	0	1,87	0	0	0,8	0	0,11
Mt-0	0	0,71	0	0	0,57	0	0,04
Lip-0	0	0	0	0	0,16	0	0,09
No-0	0	0,28	0	0	0,29	0,5	0,09
Ler	0,12	0	0	0	0,09	0,19	0,09
Di-1	0,12	0,74	0	0	0,25	0	0,14
Pi-0	0	0	0	0	0,84	0	0,1
Cvi-0	0,96	0	3,31	0	0,13	0	0,06
Hodja	7,6	0	0,13	0	0,67	1,41	0,04
Tsu	0	0	0	0	0,32	5,58	0

<sup>7</sup> Teneurs non déterminées pour l'écotype Ws



VU :

**Le directeur de thèse**  
(Nom et Prénom)

VU :

**Le co-directeur de thèse**  
(Nom et Prénom)

