



Vers une meilleure compréhension des systèmes antioxydants chez la plante face aux contraintes environnementales : approches expérimentales et modélisation mécaniste

Marie Sylviane Rahantaniaina

► To cite this version:

Marie Sylviane Rahantaniaina. Vers une meilleure compréhension des systèmes antioxydants chez la plante face aux contraintes environnementales : approches expérimentales et modélisation mécaniste. Biologie végétale. Sorbonne Université, 2018. Français. <NNT : 2018SORUS246>. <tel-02372940>

HAL Id: tel-02372940

<https://theses.hal.science/tel-02372940v1>

Submitted on 20 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Sorbonne Université

Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement d'Ile de France (ED129)

Institut des Sciences des Plantes-Paris-Saclay, IPS2 / Equipe Stress oxydant, signalisation redox et chromatine

*Institut National de Recherche Agronomique, INRA / Equipe Ecophysiologie, et physico-chimie des interactions
végétation-atmosphère*

Vers une meilleure compréhension des systèmes antioxydants chez la plante face aux contraintes environnementales :

Approches expérimentales et modélisation mécaniste

Par Marie Sylviane RAHANTANIAINA

Thèse de Doctorat de Biologie

Dirigée par Graham NOCTOR et Andrée TUZET

Présentée et soutenue publiquement le 12/04/2018

Devant un jury composé de :

KRIEGER-LISZKAY Anja	Directrice de Recherches, CEA (Saclay, France)	Rapporteur
NOCTOR Graham	Professeur, Université Paris Sud (Orsay, France)	Directeur de thèse
SAVOURE Arnould	Professeur, Université Pierre et Marie Curie (Paris, France)	Examineur
STEVENS Rebecca	Chargée de Recherches, INRA (Avignon, France)	Rapporteur
TUZET Andrée	Chargée de Recherches, INRA (Grignon, France)	Directrice de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

A ma mère !

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier mes directeurs de thèse Mme Andrée Tuzet et Mr Graham Noctor, pour m'avoir accueilli dans leur équipe respectif et fait confiance en me confiant ce projet de thèse. Merci du fond du cœur pour votre soutien, vos enseignements, vos disponibilités, vos conseils tout au long de cette étude.

Je souhaite également remercier Mme Anja Krieger-Liszkay, Mme Rebecca Stevens et Mr Arnould Savouré pour avoir accepté de juger ce travail.

Merci à Mr Hervé Le Treut pour l'obtention du financement m'ayant permis d'effectuer cette thèse de doctorat. Merci pour m'avoir accueilli et soutenu dans les moments difficiles. Merci également à Mme Laurence Picon pour son soutien et son aide précieuse. Merci à Mme Laurence Amsili-Touchon qui m'a rendu facile toutes les démarches administratives tout au long de ce travail de doctorat.

Merci à Mrs Jean-Philippe Reichheld et Vincent Fromion pour avoir suivi ce travail via les comités de thèse. Merci pour vos conseils qui m'ont aiguillé dans les grandes étapes de cette thèse.

Je souhaite remercier Mme Amna Mhamdi pour m'avoir appris depuis mon stage de Master 2 des techniques de laboratoire indispensables à mon travail ainsi que pour tous ses conseils.

Je remercie également Mme Emmanuelle Issakidis-Bourguet pour ses précieux conseils en termes de clonage qui m'ont beaucoup aidé. Je la remercie également pour la relecture de ce manuscrit, pour sa bonté, sa bonne humeur et sa gentillesse qui émerveillaient toujours notre bureau.

Merci aux membres de mon équipe Stress oxydant, signalisation redox et chromatine : à Mme Myroslawa Miginiac-Maslow, à Mr Dao-Xiu Zhou, à Mme Hélène Vanacker, à Mr Gilles Chatel-Innocenti, à Mme Caroline Lelarge-Trouverie, à tous les post-docs, les doctorants et les stagiaires pour vos conseils et vos aides précieuses pendant ce travail. Merci à Mr Camille Chambon de notre équipe de l'INRA de Grignon pour ses précieux conseils.

Je remercie toutes les personnes extérieures à mes deux équipes, avec qui j'ai pu collaborer et qui m'ont appris de nouvelles techniques. Merci à Mr Frank Van Breusegem et Mme Jenny Neukermans de l'Université de Gand pour la technique de cDNA-AFLP, merci à Mr Yves Jolivet et Mr Anthony Gandin de l'Université de Nancy pour les manipes sur la fumigation à l'ozone.

Je souhaite remercier tout le personnel des plateformes aussi bien de l'IPS2 que de l'Imagerie-Gif pour m'avoir appris toutes les différentes techniques de microscopie utilisées dans cette étude.

Merci à l'ensemble du personnel de l'ancien IBP devenu IPS2 et de l'ancien EGC devenu ECOSYS.

Merci à Mr Michel Dron, Mr Bertrand Gakière et Mme Linda de Bont pour m'avoir accompagné dans les moindres difficultés de cette thèse.

Merci à mes amis, à ma famille pour leur soutien.

Merci à ma mère car selon un proverbe malagasy : «Ny hazo no vanon-ko lakana ny tany naniriany no tsara».

Enfin merci à toi mon mari, merci pour m'avoir soutenu pour le meilleur et pour le pire !

Abréviations

3PGA	3-phosphoglycérate
5-OP	5-oxoproline
5-OPase	5-oxoprolinase
A	Assimilation nette
ABA	Acide abscissique
ABC	ATP binding cassette
ABCC	Sous-classe C des transporteurs ABC
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADN-T	ADN de transfert
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AO	Amine oxydase
AO	L-aspartate oxydase
AOX	Oxydase alternative
APX	Ascorbate peroxydase
ARN	Acide ribonucléique
ASC	Ascorbate
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
Avr	Avirulent
BAG	Athanogène associé à Bcl-2
BET	Bromure d'éthidium
BPGA	1,3-bisphosphoglycérate
BSA	Albumine de sérum bovin
CaMV	Virus de mosaïque du chou-fleur
CAT	Catalase
CDPK	Protéines kinases calcium dépendantes
Cfu	Unité formant une colonie
Chl	Chlorophylle
Chl a	Chlorophylle a
Chl b	Chlorophylle b
Ci	Concentration en CO ₂ dans le mésophylle
CLT	Chloroquinone resistance transporter-like
COE	Complexe d'oxydation de l'eau
Cpep	Carboxypeptidase
CYB561	Cytochrome de type b561
Cys	Cystéine
Cyt	Cytochrome
Cytb	Cytochrome de type b

Cytb6/f	Complexe protéique contenant les cytochromes b6 et f
DHA	Déhydroascorbate
DHAR	Déhydroascorbate réductase
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dnase	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxyribonucléotides
DO	Densité optique
DTNB	Acide dithionitrobenzoïque
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tetra acétique
ETH	Ethylène
FAD	Flavine adénine dinucléotide
Fd	Ferrédoxine
Fdred	Forme réduite de la ferrédoxine
Fdox	Forme oxydée de la ferrédoxine
Flg	Flagelline
FNR	Ferrédoxine-NADP ⁺ réductase
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
G3PDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase cytosolique NADP ⁺ -dépendante
G6P	Glucose-6-phosphate
γ-EC	γ-Glutamylcystéine
γ-ECS	γ-EC synthetase
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GFP	Green fluorescent protein
GGC	γ-glutamylcyclotransférase
GGT	γ-glutamyl transpeptidase
Glu	Glutamate
GLX	Glyoxylate
Gly	Glycine
GLYC	Glycérate
GLYCLT	Glycolate
GOGAT	Glutamate synthase
GOX	Glycolate oxydase
GPDH	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
GPOX	Gaïacol peroxydase
GR	Glutathion réductase
GRX	Glutarédoxine
g _{st}	Conductance stomatique
GSH	Glutathion réduit
GSH-S	Glutathion synthétase

GSNO	S-nitrosoglutathion
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S-transférase
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Hpi	Heure post-inoculation
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HPYR	hydroxypyruvate
HR	Réaction d'hypersensibilité
ICDH	Isocitrate déshydrogénase
JA	Acide jasmonique
K_M	Constante de Michaelis- Menten
KO	Knock-out
LB	Luria Bertani
MCP	Mort cellulaire programmée
MDHA	Monodéhydroascorbate
MDHAR	Monodéhydroascorbate réductase
MF	Matière fraîche
MI	Membrane interne de la mitochondrie
MRP	Multidrug resistance-associated protein
MV	Méthylviologène
NAD^+	Forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide
$NADP^+$	Forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
$NADPH_{ox}$	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NR	Nitrate réductase
NTR	NADPH-thiorédoxine réductase
OPPP	Voie oxydative des pentoses phosphate
OPT	Oligopeptide transporter
OXO	Oxalate oxydase
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PAR	Rayonnement Photosynthétiquement Actif
PC	Plastocyanine
PCR	Polymerase chain reaction ou réaction de polymérase en chaîne
PCS	Phytochélatine synthétase
PEP	Phosphoénolpyruvate
PET	Chaîne de transfert d'électrons photosynthétique
PG	Phosphoglycolate
PGA	3-phosphoglycerate

Pi	Phosphate inorganique
PMP	Protéines membranaires peroxysomales
PMP29	Protéine membranaire peroxysomale de 29 kDa
POX	Peroxydase
Ppm	Parties par millions, en volume
PQ	Plastoquinone
PQ ⁻	Plastosémiquinone
PQH ₂	Plastohydroquinone
PR	Pathogenesis related protein
PRX	Peroxydase
PRXII	Péroxiredoxine de type II
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
pv	Pathovar
PVP	Poly-vinyl-pyrrolidone
Q	Quinone
QA-QB	Accepteurs quinone primaires de PSII
QR	Quinone réductase
qRT-PCR	quantitative-reverse transcript PCR
RBOH	Respiratory burst oxidase homologue
RE	Réticulum endoplasmique
Redox	Oxydo-réduction
RET	Chaîne de transfert d'électrons respiratoire
ROS	Reactive oxygen species ou espèces réactives de l'oxygène
RPE	Résonance paramagnétique électronique
RSE	Résonance de spin électronique
RT	Reverse transcription
RuBisCO	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
RuBP	Ribulose 1,5-bisphosphate
SA	Acide salicylique
SAA	Systemic acquired acclimation
SAR	Systemic acquired resistance
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
T	Température
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TCA	Cycle des acides tricarboxyliques
TF	Facteur de transcription
TI	Inhibiteur de transcription

TRIS	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TRX	Thiorédoxine
UV	Ultra-violet
WT	Wild type ou souche/lignée sauvage
X	Composé conjugué à S
XOD	Xanthine oxydase

Sommaire

Partie I. Introduction générale	1
I.1. Présentation du sujet de thèse. Contextes environnemental, socio-économique et politique.....	2
I.2. Contexte scientifique du sujet.....	4
I.2.1. ROS, espèces réactives de l'oxygène.....	5
I.2.1.1. Sites de production des ROS de la cellule végétale	7
I.2.1.1.1. Production apoplastique des ROS.....	7
I.2.1.1.2. Formation des ROS dans les chloroplastes	8
I.2.1.1.3. ROS dans les mitochondries	8
I.2.1.1.4. Peroxisomes, sites importants de formation de H ₂ O ₂	9
I.2.1.2. Caractéristiques chimiques des ROS	11
I.2.2. Fonctions des ROS dans la plante.....	12
I.2.2.1. Régulation des processus de développement par les ROS	12
I.2.2.2. ROS dans la plante face aux contraintes environnementales	13
I.2.2.2.1. Stress salin	13
I.2.2.2.2. Exposition à l'ozone	13
I.2.2.2.3. Infection par des agents pathogènes	13
I.2.2.3. ROS et mort cellulaire programmée (MCP)	14
I.2.3. ROS au cœur de la signalisation intra et intercellulaire en situation de stress	15
I.2.3.1. Acheminement du signal ROS apoplastique	15
I.2.3.2. Signalisation ROS dans les chloroplastes	18
I.2.3.3. Rôles des mitochondries dans la signalisation ROS	19
I.2.3.4. Transduction du signal ROS des peroxysomes	20
I.2.4. Métabolisme des ROS	21
I.2.4.1. Molécules antioxydantes	21
I.2.4.2. Voie ascorbate-glutathion	26
I.2.4.2.1. Mise en évidence de la voie ascorbate-glutathion	26
I.2.4.2.2. Propriétés moléculaires et biochimiques des acteurs la voie ascorbate-glutathion	26
I.2.4.2.3. Couplage entre ascorbate et glutathion?	28
I.2.5. Glutathion : molécule vitale dans la régulation redox thiol/disulfure dépendante dans la cellule	29
I.2.5.1. Synthèse du glutathion et sa régulation	29
I.2.5.2. Rôles du glutathion	31
I.2.5.3. Transport et dégradation du glutathion	32
I.2.5.4. Importance du potentiel redox du glutathion	34
I.2.5.5. Glutathion, molécule signale dans la signalisation redox	35

I.3. Objectifs de l'étude et présentation des résultats	37
I.3.1. Analyses des voies antioxydantes glutathion-dépendantes	38
I.3.1.1. Recherches bibliographiques	38
I.3.1.2. Etudes de mutants d'Arabidopsis.....	38
I.3.2. Modélisation des interactions entre la catalase et la voie ascorbate-glutathion dans le métabolisme du H_2O_2	39
I.3.3. Format de la présentation des résultats	40
Partie II. Résultats	41
II.1. Etude approfondie des voies antioxydantes glutathion-dépendantes	42
II.1.1. Préambule 1	43
Article 1: Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants?	44
II.1.2. Discussion et Transition 1	45
II.2. Rôles des différentes isoformes de DHAR dans l'oxydation du glutathion impactant la voie de signalisation liée à l'acide salicylique	46
II.2.1. Préambule 2	47
Article 2: Cytosolic and chloroplastic DHARs cooperate in oxidative stress-driven activation of the salicylic acid pathway	48
II.2.2. Discussion et Transition 2	49
II.3. Analyse des rôles des gènes de glutathion S-transférases et de peroxyrédoxines candidats dans l'oxydation du glutathion	51
II.3.1. Préambule 3	52
Article 3: Glutathione oxidation in response to intracellular H_2O_2 : Key but overlapping roles for dehydroascorbate reductases	53
II.3.2. Discussion et Transition 3	54
II.4. Modélisation de la production et du métabolisme du H_2O_2 en conditions de croissance optimales et stressantes	55
II.4.1. Préambule 4	56
Article 4: Analyzing the function of catalase and the ascorbate-glutathione pathway in H_2O_2 processing: Insights from an experimentally constrained kinetic model	58
II.4.2. Discussion et Transition 4	59

Partie III. Discussions et conclusions générales	61
Partie IV. Perspectives	68
Partie V. Matériels et méthodes utilisés	73
V.1. Matériels.....	74
V.1.1. Matériel végétal, conditions et milieux de culture.....	75
V.1.1.1. Semis in vitro	75
V.1.1.2. Semis en pots sur terreau.....	75
V.1.1.2.1. Culture des plantes en serre	75
V.1.1.2.2. Culture des plantes en chambre de culture/de croissance.....	76
V.1.2. Matériel bactérien.....	76
V.1.2.1. Souches bactériennes pour les clonages	76
V.1.2.2. Souches bactériennes pour la transformation des plantes.....	76
V.1.2.3. Souche bactérienne pour les tests pathogènes	76
V.1.2.4. Plasmides et vecteurs de clonage	77
V.1.2.5. Amorces nucléotidiques	77
V.2. Méthodes.....	78
V.2.1. Techniques de biologie moléculaire.....	79
V.2.1.1. Techniques de clonage et transformation des plantes	79
V.2.1.1.1. Le système Gateway®.....	79
○ Préparation des séquences d'intérêt.....	79
○ Préparation des clones d'entrée.....	79
○ Préparation des clones de destination	80
V.2.1.1.2. Transformation des bactéries par électroporation	80
V.2.1.1.3. Sélection des bactéries transformées et PCR sur colonie	80
V.2.1.1.4. Electrophorèse des produits de PCR	80
V.2.1.1.5. Extraction d'ADN plasmidique	80
V.2.1.1.6. Digestion des plasmides	81
V.2.1.1.7. Séquençage.....	81
V.2.1.1.8. Obtention des lignées transgéniques	81
V.2.1.2. Criblage par PCR des insertions d'ADN-T.....	81
V.2.1.2.1. Extraction de l'ADN génomique	81
V.2.1.2.2. PCR de géotypage	82
V.2.1.3. Mesure de l'expression des gènes	82
V.2.1.3.1. Extraction des ARN totaux	82
V.2.1.3.2. Transcription-inverse des ARNm.....	82
V.2.1.3.3. RT-PCR quantitative	82

V.2.1.3.4. cDNA-AFLP	83
V.2.2. Techniques de biochimie.....	83
V.2.2.1. Mesure des activités extractibles des enzymes par spectrophotométrie	83
V.2.2.1.1. Extraction des protéines hydrosolubles	83
V.2.2.1.2. Dosage des protéines totales	84
V.2.2.1.3. Ascorbate peroxydase	84
V.2.2.1.4. Catalase	84
V.2.2.1.5. Glutathion réductase.....	84
V.2.2.1.6. Déhydroascorbate réductase.....	85
V.2.2.1.7. Monodéhydroascorbate réductase	85
V.2.2.2. Analyse des métabolites	85
V.2.2.2.1. Dosage par spectrophotométrie de l'ascorbate et du glutathion	85
○ Extraction acide	85
○ Ascorbate réduit.....	85
○ Ascorbate total.....	86
○ Glutathion	86
○ GSSG.....	86
V.2.2.2.2. Dosage de l'acide salicylique par HPLC	86
○ Système d'acquisition des profils métaboliques.....	86
○ Extraction de l'acide salicylique.....	87
○ Analyse de l'acide salicylique par HPLC	87
○ Traitement et comparaison des données	87
○ Calcul du rendement de l'extraction par comptage radioactif	87
V.2.3. Techniques d'approches physiologiques	88
V.2.3.1. Stress biotique, tests de sensibilité à <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	88
V.2.3.1.1. Cultures des bactéries.....	88
V.2.3.1.2. Inoculations de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	88
V.2.3.1.3. Échantillonnage.....	88
V.2.3.2. Stress abiotiques.....	89
V.2.3.2.1. Traitement à l'ozone.....	89
○ Description du dispositif.....	89
○ Procédure de fumigation et échantillonnage	89
V.2.3.2.2. Traitement au paraquat (methyl viologène)	89
V.2.3.2.3. Traitement au 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT)	90
V.2.3.2.4. Exposition au cadmium	90
V.2.3.2.5. Exposition au NaCl et au mannitol.....	90
V.2.4. Techniques d'imagerie	90
V.2.4.1. Observation des feuilles à la loupe binoculaire	90
V.2.4.2. Détection de la mort cellulaire	91
V.2.4.2.1. Coloration des cellules mortes au bleu de trypan	91

V.2.4.2.2. Observation des échantillons au microscope	91
V.2.4.3. Localisation subcellulaire, microscopie confocale à balayage laser.....	91
V.2.5. Techniques d'analyses in silico	91
V.2.5.1. Sites de bases de données génomiques	91
V.2.5.2. Genevestigator, un site de bases de données transcriptomiques	92
V.2.5.3. Brenda, une banque de données sur les enzymes	92
V.2.5.4. Tests statistiques	92
V.2.5.5. IQmaterials.....	93
V.2.5.6. Image J	93
V.2.5.7. Fortran 90	93
 Partie VI. Bibliographie	 94
 Partie VII. Annexes	 128
 Partie VIII. Liste des illustrations	 136
 Partie VIX. Liste des tableaux	 138

Partie I. Introduction générale

I. Introduction générale

I.1. Présentation du sujet de thèse

Contextes environnemental, socio-économique et politique

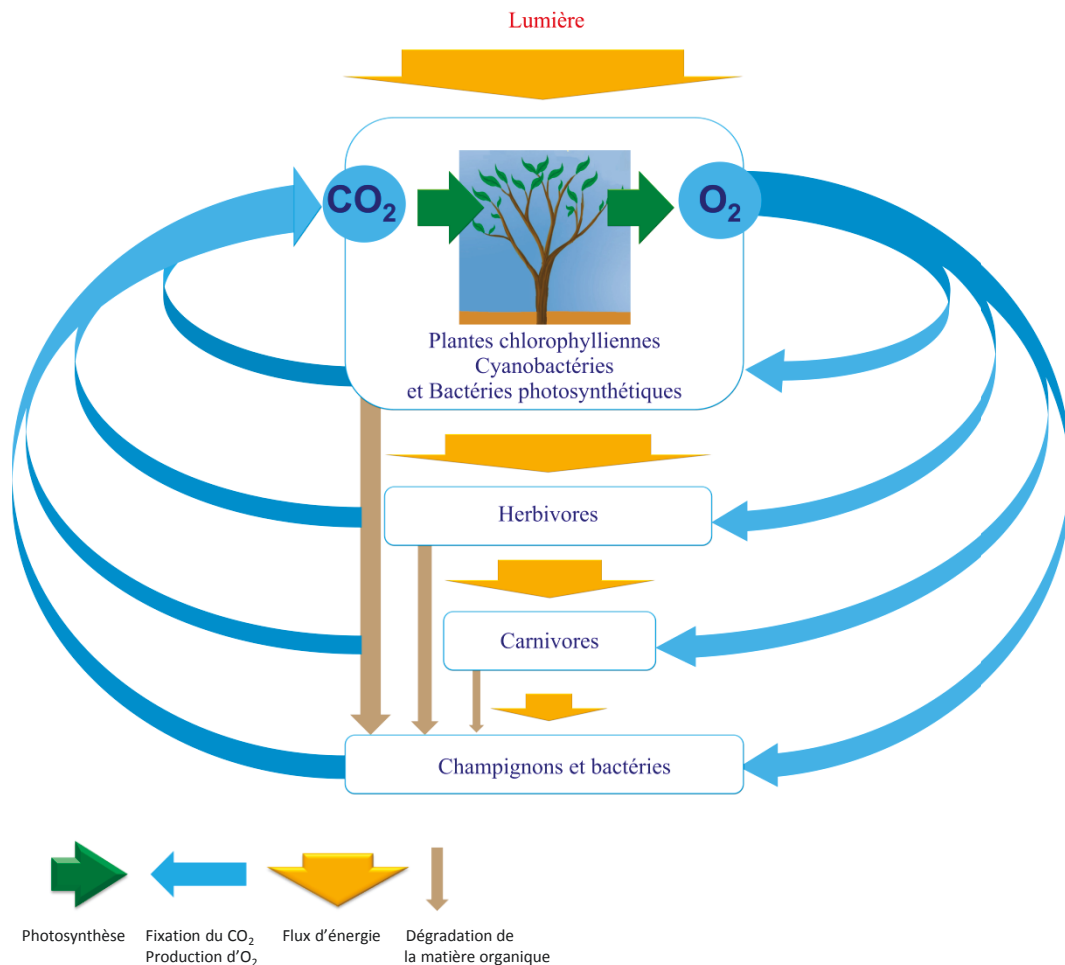


Figure 1 : Importance des organismes chlorophylliens dans le cycle du carbone, de l'oxygène et dans le flux d'énergie dans la biosphère

Tout comme les cyanobactéries et les bactéries photosynthétiques, la plante chlorophyllienne participe activement au cycle du carbone, de l'oxygène et au transfert du flux d'énergie. A la lumière, ces organismes chlorophylliens assurent la fixation du dioxyde de carbone (CO₂) et libère du dioxygène (O₂) via la photosynthèse. La photosynthèse produit de la matière organique, utilisée par les consommateurs primaires (herbivores) et secondaires (carnivores). La décomposition des producteurs primaires et secondaires est prise en charge par les microorganismes du sol permettant la génération de nouvelles sources de carbone. Ces microorganismes sont représentés par les champignons et les bactéries. Schéma modifié à partir de <http://www.snv.jussieu.fr>

Aussi importantes que les océans, qui regorgent tout un écosystème indispensable à la vie sur Terre, les plantes jouent un rôle irremplaçable en termes d'équilibre naturel. Elles servent de réserve de biodiversité terrestre, de protection des sols, d'épuration des eaux, de foyers de vie et de bien-être des populations. Les espèces végétales constituent un pilier de la chaîne alimentaire en tant que producteurs primaires de la matière organique indispensables aux herbivores, qui seront à leur tour consommés par les carnivores (Fig. 1). Elles jouent en plus un rôle majeur dans la régulation du climat (Fig. 1). En effet, tout comme les océans, les écosystèmes forestiers sont de véritables réservoirs de carbone pouvant emmagasiner le dioxyde de carbone, CO₂, émis dans l'atmosphère. La forêt amazonienne avec celle du Bassin du Congo et de l'Asie du sud-est forment une « ceinture verte » qui encercle la Terre et freine le dérèglement climatique en absorbant le CO₂.

Cependant, contrairement aux autres êtres vivants qui peuvent fuir ou s'abriter, quand leur environnement change et les agresse, les plantes sont plus vulnérables. En tant qu'organismes sessiles, elles doivent faire face à tout type de contraintes. Ces dernières peuvent être d'origine biotiques, comme les attaques par des parasites qui sont à l'origine de maladie, ou encore les morsures d'insectes et d'animaux et/ou abiotiques tels que les changements climatiques, les polluants atmosphériques, ou les métaux lourds (Fig. 2). En plus des contraintes environnementales dites naturelles, il existe également les contraintes dues aux activités humaines. Ces dernières regroupent l'agriculture, l'élevage, l'industrie, le trafic routier, la déforestation *etc.* Ces activités ont souvent pour conséquences : la dégradation des sols (Bond et Zaloumis, 2016 ; Page et Hooijer, 2016), leur salinisation (Katerji et al., 2012), leur désertification (Rabesiranana et al., 2016), les changements climatiques (Le Treut 2009 ; Le Treut et al, 2010) impactant négativement sur les rendements des plantes.

Au niveau socio-économique, dans le contexte actuel d'explosion démographique, les pertes en terme de biomasse mènent et ont déjà mené à l'insécurité alimentaire dans les pays les plus défavorisés (www.fao.org). Sur le plan économique, les pertes de rendement causées par les contraintes environnementales peuvent se traduire par des pertes en sources de revenu. Et, si la prise de conscience des impacts du réchauffement climatique date depuis les années 1970 (Sharney, 1979), dans le domaine politique ce n'est que depuis 2015 que plusieurs dirigeants du monde entier ont unanimement adopté le premier accord universel sur le climat. Ceci grâce à la COP 21 ou 21^{ème} Conférence des parties à la convention-cadre des Nations unies sur les changements climatiques qui a permis d'adopter l'Accord de Paris. Il s'agit de contenir l'élévation de la température moyenne de la planète, nettement en dessous de 2°C, par rapport aux niveaux préindustriels (<http://unfccc.int>).

Compte tenu de cet état des lieux et afin de mieux anticiper les impacts des contraintes environnementales sur la productivité végétale, il est indispensable d'apporter davantage de connaissances scientifiques et de proposer des outils nouveaux de compréhension. Dans cette optique, j'ai eu la chance de participer à un projet scientifique qui vise la compréhension des impacts des contraintes environnementales aussi bien biotiques qu'abiotiques chez la plante au niveau moléculaire. Mon travail a pour objectifs globaux de mieux comprendre les systèmes antioxydants (ces systèmes seront définis un peu plus loin dans la Sous-partie I.2) chez la plante face aux contraintes environnementales et de proposer un nouveau modèle mécaniste pouvant servir d'outil de base pour une compréhension plus large des conditions de stress que subissent les plantes.

I. Introduction générale

I.2. Contexte scientifique du sujet

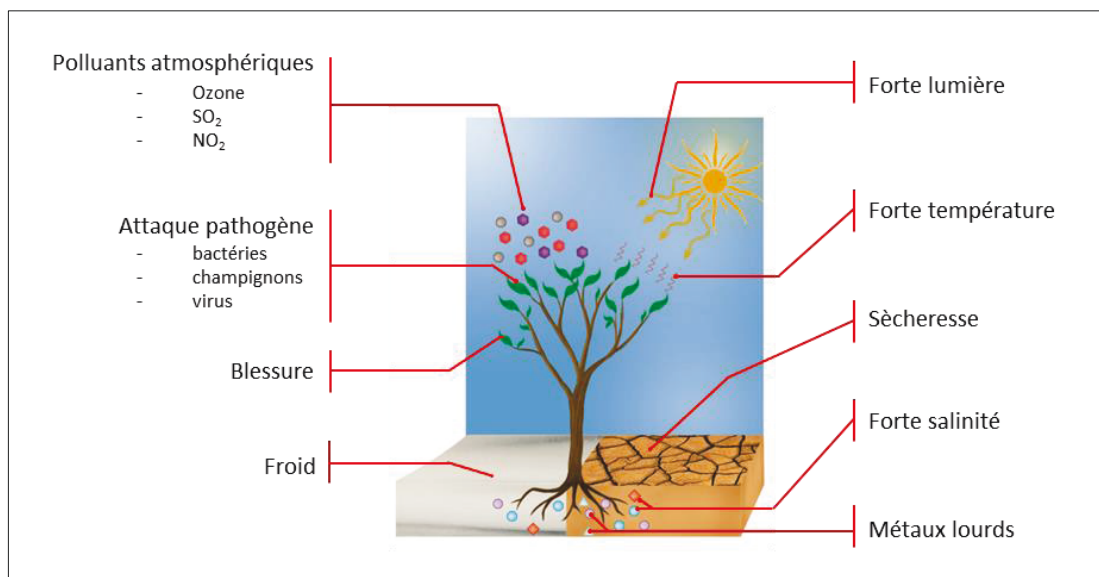


Figure 2 : Plante et contraintes environnementales

Les contraintes environnementales peuvent être biotiques tels que l'attaque pathogène, les blessures/morsures des insectes ou des animaux et abiotiques, tels que les polluants atmosphériques, les blessures par le vent, le froid, la forte lumière, la forte température, la sécheresse, la forte salinité ou encore l'exposition aux métaux lourds. Schéma modifié à partir de Vickers et al., 2009.

La quasi-totalité des contraintes environnementales d'origines naturelles ou engendrées par les activités humaines (Fig. 2), influent sur l'équilibre métabolique des cellules. En effet, les stress biotiques et/ou abiotiques impliquent une signalisation redox qui intègre toute une cascade de réactions d'oxydo-réduction, déclenchée par les espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour « Reactive Oxygen Species »), ainsi que par tous les mécanismes mis en jeu par lesquels les cellules des plantes perçoivent les variations de l'environnement et mettent en place les ajustements appropriés dans l'expression de ses gènes, de son métabolisme et sa physiologie (Noctor et al., 2017).

I.2.1. ROS, espèces réactives de l'oxygène

Comme tous les êtres vivants, les plantes produisent des espèces intermédiaires réactives de l'oxygène, connues couramment sous l'acronyme anglais ROS (Fig. 3 ; del Río, 2015). Cette production se passe dans tous ses compartiments cellulaires (Bratt et al., 2016 ; Mignolet-Spruyt et al., 2016). L'oxygène moléculaire, dans son état fondamental est sous forme triplet $^3\text{O}_2$ et possède deux électrons non appariés (Mulliken 1928 ; Ramsay et Hinze, 1975 ; Larin et Vercauteren, 2001). Cinétiquement, il est peu réactif. Néanmoins, au cours de l'activité métabolique, l' O_2 donne lieu à des états intermédiaires hautement réactifs, ce sont les ROS. Ces ROS peuvent être radicalaires ou non radicalaires (Tableau 1 ; Halliwell et Gutteridge, 2015).

Tableau 1 : Principales espèces réactives de l'oxygène (Halliwell et Gutteridge, 2015)

Radicaux libres	Formes non radicalaires
Radical superoxyde, $\text{O}_2^{\cdot -}$	Peroxyde d'hydrogène, H_2O_2
Radical hydroperoxyde, $\text{HO}_2^{\cdot}$	Oxygène singulet, $^1\text{O}_2$
Radical hydroxyle, $\cdot\text{OH}$	Acide hypo-chloreux, HClO
Radical peroxyde, $\text{ROO}^{\cdot}$	Peroxynitrite, $\text{ONOO}^{\cdot}$
Radical alcoxyde, $\text{RO}^{\cdot}$	Ozone, O_3

Pour les radicaux peroxyde et alcoxyde, R désigne un substrat organique.

Pour franchir la barrière énergétique empêchant ou ralentissant les réactions de l' O_2 avec les molécules organiques, des réactions photochimiques ou des catalyses enzymatiques existent dans la cellule (Fig. 3 ; Wigner, 1932 ; Rohatgi-Mukherjee, 1978). Afin d'acquies un niveau énergétique plus élevé, l' O_2 peut, par exemple, inverser son spin. Sa configuration quantique parallèle $\uparrow\uparrow$ (Mulliken 1928 ; Ramsay et Hinze, 1975 ; Larin et Vercauteren, 2001), passe alors en configuration antiparallèle $\uparrow\downarrow$ caractéristique de l'état non radicalaire singulet, celui de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ (Fig. 3A). *In vivo* un tel exploit ne peut se faire qu'en présence d'une forte énergie apportée par le photon (Einstein, 1905). Au cours de la photosynthèse, l'énergie lumineuse utilisée par la plante permet la formation de l' $^1\text{O}_2$ (nous y reviendrons dans la Section I.2.1.1.2 ; Asada, 2006 ; Triantaphylidés et Havaux, 2009 ; Fischer et al., 2013). Néanmoins, une étude récente a également rapporté la possible formation de l' $^1\text{O}_2$ indépendamment de la lumière dans des tissus non photosynthétiques (Mor et al., 2014). Le mécanisme reste encore cependant à élucider (Mor et al., 2014). L' O_2 peut aussi, à l'aide de catalyseurs enzymatiques, accepter un électron supplémentaire pour augmenter son niveau d'énergie en anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Fig. 3B). Chez les végétaux, les oxydases et les peroxydases de type III jouent ce rôle catalytique (Section I.2.1.1.1 ; Halliwell et Gutteridge, 2015 ; Kärkönen et Kuchitsu, 2015). Au niveau des membranes de certains

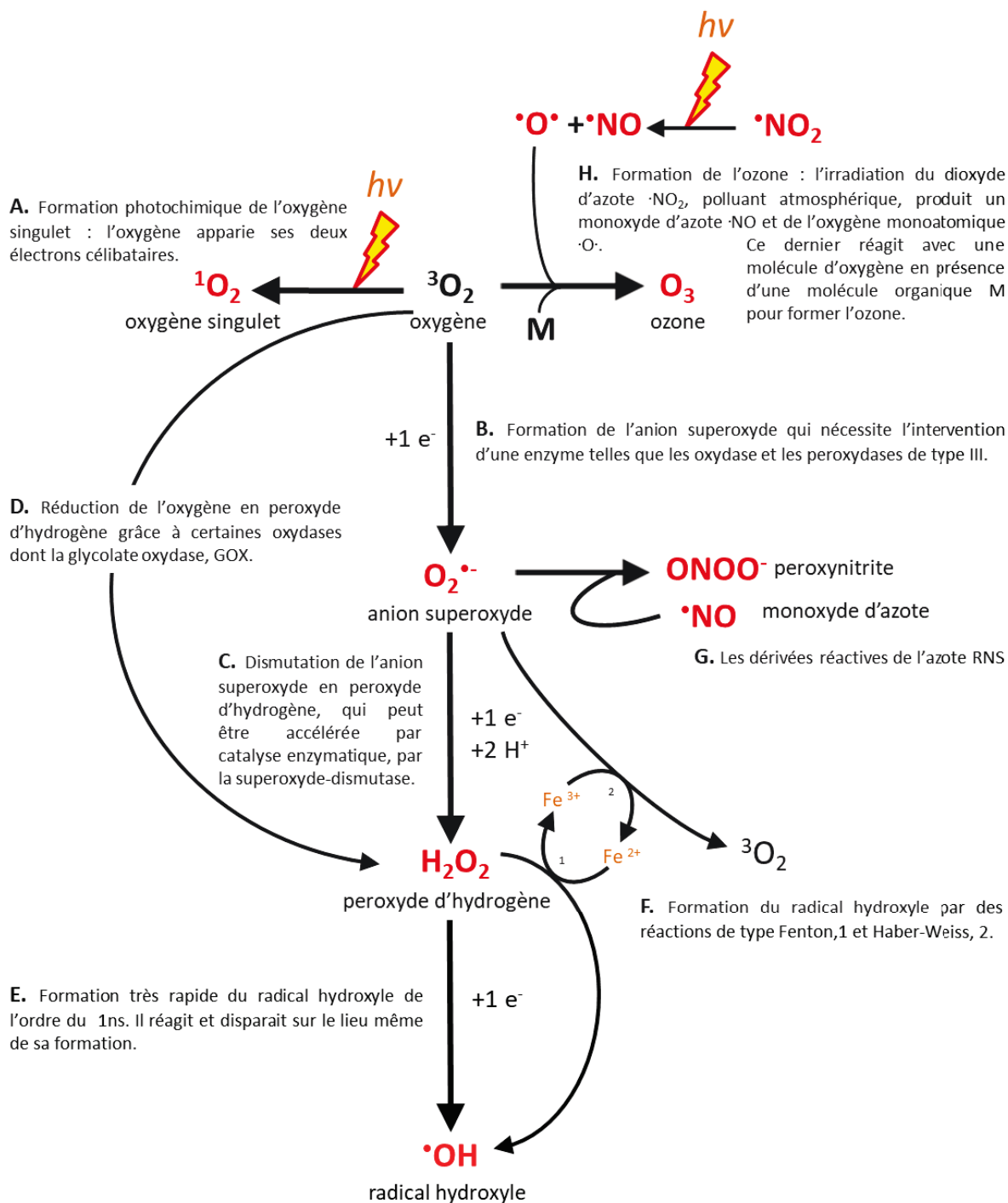


Figure 3 : Différentes voies, non exhaustives, de formation des ROS (radicaux et molécules écrites en rouge)

compartiments de la cellule, d'autres mécanismes tels que les chaînes de transfert d'électrons permettent également la transition énergétique de l' O_2 en $O_2^{\cdot-}$ (Section I.2.1.1). L' $O_2^{\cdot-}$, une fois formé, peut donner lieu à d'autres ROS, notamment du peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 .

Le H_2O_2 résulte de l'ajout d'un électron supplémentaire et de deux atomes d'hydrogène (Fig. 3C ; Halliwell et Gutteridge, 2015). Il s'agit d'une réaction exothermique, spontanée, mais elle peut être accélérée par catalyse enzymatique faisant intervenir les superoxyde-dismutases qui sont des métalloenzymes (Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD et Ni-SOD ; Fig. 3C ; Fridovich, 1986 ; Kliebenstein et al., 1998 ; Alscher et al., 2002). Le H_2O_2 peut également être formé, indépendamment du superoxyde, par la réduction de l' O_2 . Cette réaction est catalysée par certaines oxydases comme les glycolates oxydases, GOX (Fig. 3D ; Section I.2.1.1.4 ; Foyer et Noctor 2016). Le clivage de la molécule de H_2O_2 fait apparaître le radical hydroxyle, $^{\cdot}OH$, une des ROS les plus réactives (Fig. 3E ; voir la Section I.2.1.2 ; Halliwell et Gutteridge, 2015). L' $^{\cdot}OH$ peut aussi résulter de réactions de type Fenton et Haber-Weiss dépendantes d'ions métalliques (Fig. 3F ; Haber et Weiss, 1934).

Certaines espèces réactives de l'oxygène sont aussi azotées, elles font parties des RNS « Reactive Nitrogen Species » dont les plus étudiées sont : le monoxyde d'azote, $^{\cdot}NO$ et le peroxynitrite $ONOO^{\cdot-}$ (Fig. 3G). A ce jour, les systèmes de génération des RNS chez la plante ne sont toujours pas entièrement caractérisés (Tewari et al, 2013 ; del Río, 2015). Selon les dernières données, l'oxyde nitrique synthase (NOS) responsable de la production de $^{\cdot}NO$, n'existerait pas chez les plantes. Par contre, d'après la littérature, plusieurs autres sources potentielles de $^{\cdot}NO$ existent (Mur et al., 2012 ; Hancock, 2012 ; del Río et al., 2014) : des activités NOS ont été mesurées à partir d'extraits protéiques de plantes, et des inhibiteurs de NOS animales peuvent réduire la production de $^{\cdot}NO$ chez les plantes (Wendehenne et al., 2001 ; Copras et al., 2009 ; del Río et al., 2011). Sur cette base, l'enzyme responsable est nommée « oxyde nitrique synthase-like » ou NOS-like. Le $^{\cdot}NO$ et le $ONOO^{\cdot-}$ peuvent aussi être produits *in vitro* à partir du nitrite (NO_2^-) grâce à la nitrate réductase (NR-NAD(P)H-dépendante ; Yamasaki et Sakihama, 2000). Toutefois, cette activité enzymatique est secondaire et ne représente que 1% de l'activité totale de la NR d'après Planchet et al. (2005). Dans des conditions aérobies, la NR du maïs peut réduire l' O_2 en $O_2^{\cdot-}$ qui se combine avec du $^{\cdot}NO$ pour donner du $ONOO^{\cdot-}$ (Fig. 3G ; Yamasaki et Sakihama, 2000). Le $^{\cdot}NO$ peut également être produit par des voies non enzymatiques : comme résultat de réactions chimiques entre les oxydes d'azote et des métabolites végétaux tels que les caroténoïdes (Cooney et al., 1994), ou encore la décomposition de l'oxyde nitreux (N_2O) ou la réduction chimique du nitrite à pH acide (Nishimura et al., 1986 ; Klepper, 1991). Il existe donc plusieurs sources potentielles de $^{\cdot}NO$ dans la plante, incluant des systèmes aussi bien enzymatiques que non-enzymatiques (Mur et al., 2012 ; Hancock, 2012 ; del Río et al., 2014).

Par ailleurs, les ROS peuvent être également d'origine exogène à la plante (comme l' O_3 ; Tableau 1 ; Finlayson-Pitts et Pitts, 1997 ; Vainonen et Kangasjärvi, 2015). Une fois formé, l'ozone peut produire d'autres ROS au contact des constituants cellulaires (Fig. 3H ; Koziol et Whatley, 2016).

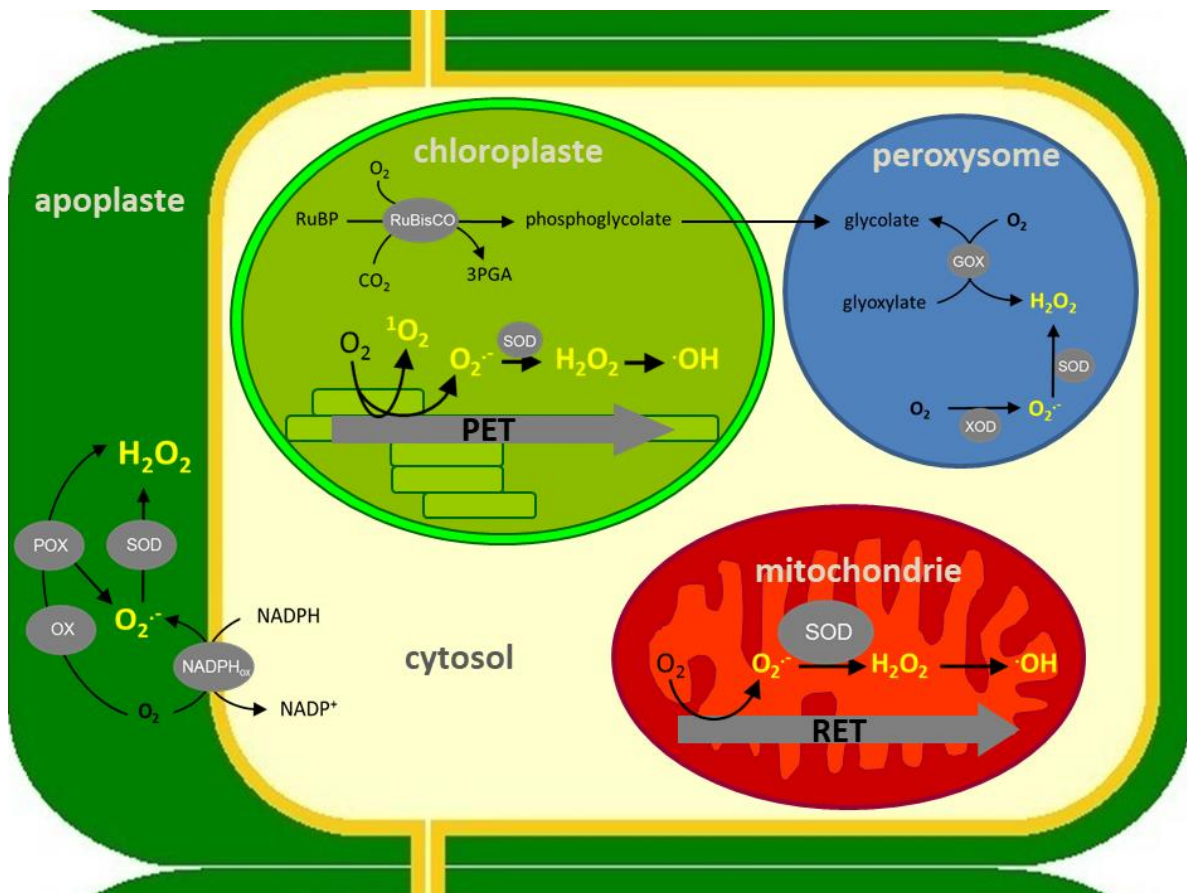


Figure 4 : Principales sources des espèces réactives de l'oxygène dans une cellule végétale

RuBP, ribulose 1,5-bisphosphate ; RuBisCO, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ; 3PGA, 3-phosphoglycérate ; PET, chaîne de transfert d'électrons photosynthétique ; GOX, glycolate oxydase ; SOD, superoxyde dismutase ; XOD, xanthine oxydase ; RET : chaîne de transfert d'électrons respiratoire ; NADPH_{ox}, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase ; POX, peroxydase. Schéma créé à partir de Mhamdi et al., 2010b et Mignolet-Spruyt et al., 2016 (stœchiométries non respectées).

I.2.1.1. Sites de production des ROS de la cellule végétale

La génération des ROS se fait dans différents compartiments de la cellule végétale. Elle s'effectue dans l'apoplaste mais elle est généralement dépendante du métabolisme basal, c'est-à-dire la photosynthèse, la photorespiration et la respiration qui se déroulent dans les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes (Fig. 4 ; Das et al., 2015 ; Kärkönen et Kuchitsu, 2015 ; Mignolet-Spruyt et al., 2016). Peu d'études existent encore sur la production des ROS dans d'autres organites, cependant nous pouvons citer celle des réticulum endoplasmiques, RE par exemple (Das et Roychoudhury, 2014).

I.2.1.1.1. Production apoplastique des ROS

Au niveau extracellulaire, la production des ROS s'effectue dans l'apoplaste, espace intercellulaire à l'extérieur de la membrane plasmique, formé par la continuité des parois cellulaires et des espaces extracellulaires. Cette production est assurée : soit par des enzymes situées dans la membrane plasmique, soit par des enzymes localisées directement dans la paroi cellulaire (Fig. 4 ; Kärkönen et Kuchitsu, 2015).

Il est bien établi que ce sont les NADPH oxydases qui constituent la source majeure de production de ROS dans l'apoplaste (Suzuki et al., 2011 ; Marino et al., 2012 ; Baxter et al., 2014 ; Demidchik, 2015). Les NADPH oxydases sont présentes dans la membrane plasmique. Elles utilisent le NADPH cytosolique comme donneur d'électrons pour réduire l' O_2 extracellulaire en $O_2^{\cdot-}$ (Figs. 3B et 4 ; Torres, 2010 ; Daudi et al., 2012 ; O'Brien et al., 2012). L' $O_2^{\cdot-}$, une fois formé, peut être dismuté en H_2O_2 par voie enzymatique catalysée par des Fe-SOD (Figs. 3C et 4 ; Alscher et al., 2002 ; Corpas et al., 2006), ou par dismutation chimique due au pH acide de la paroi cellulaire. Le radical $^{\cdot}OH$, lui, se forme à partir du H_2O_2 , par réactions de type Fenton (Fig. 3.F) impliquant un métal de transition tel que le Fe^{2+} .

Les peroxydases apoplastiques de classe III, solubles et liées de manière ionique ou covalente à la paroi cellulaire (POX ; Fig. 4 ; Blee et al., 2001 ; Takabe et al., 2001), constituent le deuxième ensemble enzymatique producteur de ROS dans l'apoplaste. Leur mécanisme de réaction est basé sur un cycle catalytique de peroxydation et d'hydroxylation (Passardi et al., 2004, 2005 ; O'Brien et al., 2012 ; Lüthje et al., 2013). En considérant que le cycle catalytique hydroxylique couple la libération de plusieurs ROS ($^{\cdot}OH$, $HO_2^{\cdot}$) avec la réduction de H_2O_2 ou d' $O_2^{\cdot-}$. Le cycle de peroxydation combine la réduction du H_2O_2 en H_2O , avec l'oxydation de divers substrats. Ceci conduit à la libération des formes oxydées de ces substrats et à la production d' $O_2^{\cdot-}$ (Liszkay et al., 2003 ; Passardi et al., 2004). Par conséquent, les deux cycles peuvent réguler la production du H_2O_2 dans l'apoplaste (Passardi et al., 2004).

L'action des quinones réductases sur la membrane plasmique peut également conduire à la production d' $O_2^{\cdot-}$ dans l'apoplaste (Lüthje et al., 1998 ; Schopfer et al., 2008 ; Kärkönen et al., 2014). Aussi, des oxydases comme les amines et polyamines oxydases, ou les oxalates oxydases entraînent la production de H_2O_2 (Angelini et al., 2010 ; Planas-Portell et al., 2013). Ces enzymes sont également retrouvées dans les peroxysomes (Section I.2.1.1.4).

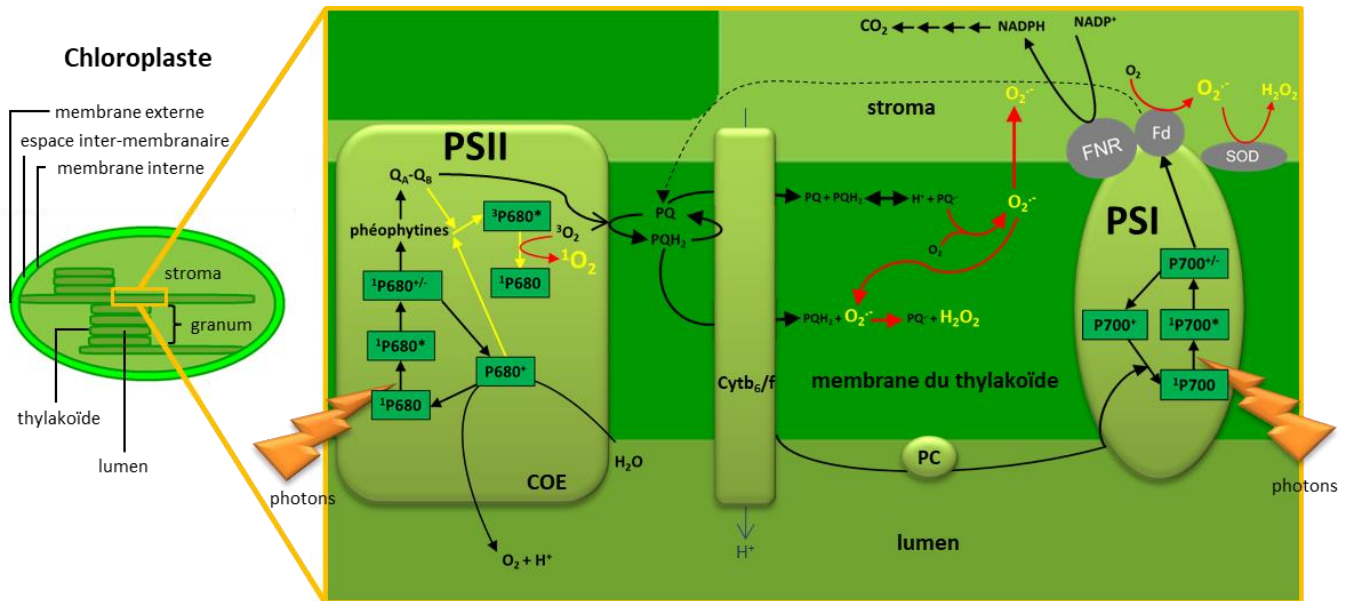


Figure 5 : Site de production des ROS au niveau de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique, PET

Il existe deux types de transport d'électrons :

(1) Le transport linéaire des électrons : Au cours de la photosynthèse, l'antenne du photosystème II (PSII) absorbe l'énergie des photons et la transmet au centre réactionnel (P680). Le P680 excité cède un électron à une phéophytine voisine, son accepteur primaire, qui le transmet à une chaîne de transporteurs linéaire en passant par les plastoquinones, les cytochrome b_6/f , les plastocyanines puis le centre réactionnel du PSI. Le dernier transporteur d'électron de la chaîne linéaire est la ferrédoxine-nicotinamide adénine dinucléotide réductase, ou FNR qui donne des électrons au $NADP^+$ qui se trouve dans le stroma. Ce dernier en acceptant deux électrons et un proton, est réduit en NADPH. Le passage entre les deux PS est associé à une translocation de protons à travers la membrane thylakoïdienne du stroma au lumen. Ensuite, les protons accumulés dans le lumen cherchent à retourner dans le stroma, toutefois la membrane du thylakoïde étant imperméable aux protons, leur seule issue est l'ATP (adénosine triphosphate) synthase, une enzyme qui assemble l'ADP et un phosphate inorganique grâce au flux de protons. Quant au centre réactionnel du PSII qui a perdu des électrons au départ, il les récupère grâce au mécanisme de photolyse de l'eau au niveau du complexe d'oxydation de l'eau (COE). (2) Le transport cyclique des électrons : Les électrons peuvent suivre un trajet cyclique qui n'implique que le PSI. L'antenne collectrice va absorber l'énergie des photons et la transmettre aux pigments du centre réactionnel (P700). Ces derniers cèdent des électrons à l'accepteur primaire, qui les transfère à la chaîne de transporteurs d'électrons situés entre le PSII et PSI. Comme cette chaîne fonctionne à sens unique, les électrons retournent au PSI où ils vont combler les vides qu'ils avaient laissés. Ce trajet cyclique permet d'accumuler des protons supplémentaires dans le lumen sans réduire de $NADP^+$ mais en favorisant la production d'ATP.

Grâce aux fonctionnements des deux types de transport d'électrons, les thylakoïdes synthétisent du NADPH et de l'ATP qui vont être majoritairement utilisés pour permettre l'assimilation de CO_2 par le cycle de Calvin. Cette voie métabolique se déroule dans le stroma. Elle implique la fixation du CO_2 sur le RuBP par la Rubisco pour former du 3PGA (voir Fig. 4), qui est ensuite réduit en sucres phosphates à partir desquels la synthèse de sucres plus complexes est réalisée. Les flèches noires pleines ou en pointillés représentent les flux de transport d'électrons issus de la photolyse de l'eau et des centres réactionnels P680 et P700. Les flèches jaunes représentent le transfert du surplus d'énergie lorsque l'intensité des photons dépasse la capacité du flux de transport d'électrons et du flux d'assimilation du CO_2 . Les flèches rouges représentent les réactions de formation des ROS. PSI/PSII, photosystèmes I et II ; COE, complexe d'oxydation de l'eau ; phéophytines, accepteurs primaires d'électrons du PSII ; Q_A-Q_B , accepteurs quinone primaires du PSII ; PQ, $PQ^{\bullet -}$ et PQH_2 , représentent respectivement la plastoquinone, la plastosémiquinone et la plastoquinone ; $Cytb_6/f$, complexe protéique contenant les cytochromes b_6 et f et le centre fer-soufre Rieske (non représenté sur le schéma) ; PC, plastocyanine ; P700, donneur primaire d'électrons dans le PSI ; Fd, ferrédoxine ; $NADP^+/NADPH$, formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; FNR, ferrédoxine-NADP réductase ; SOD, superoxyde-dismutase. Schéma élaboré à partir de Noctor et Foyer, 2000 ; Asada, 2006 ; Foyer et al., 2012 et Miret et Munné-Bosch, 2015 (stœchiométries non respectées).

I.2.1.1.2. Formation des ROS dans les chloroplastes

Les chloroplastes constituent un des compartiments les plus actifs de la cellule végétale car ils sont le siège de la photosynthèse. Ce processus qui permet de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique. La production des ROS est liée aux composants de la chaîne de transfert d'électrons ou la PET pour « Photosynthetic Electron Transport chain » des thylakoïdes (Dietz et al., 2016). Ces composants sont des systèmes membranaires constitués par des complexes de pigments et de protéines (Fig. 5 ; Dekker et Boekema, 2005). Les ROS se forment au profit d'un excès d'énergie lumineuse ou d'une fuite d'électrons de la PET.

En conditions d'excès d'énergie-photon ou de diminution du taux d'assimilation de CO_2 ; une sur-réduction des composantes en amont de la PET, entraîne une excitation à l'état triplet des chlorophylles du centre réactionnel au niveau du PSII, $^3\text{P680}^*$ (flèche jaune, Fig. 5). En profitant de l'énergie dégagée par la chlorophylle triplet, la configuration électronique des molécules d' O_2 avoisinantes s'inverse pour donner de l' $^1\text{O}_2$ (flèche rouge, Fig. 5 ; Krieger-Liszkay, 2005 ; Asada, 2006 ; Krieger-Liszkay et al., 2008 ; Fischer et al., 2013). Une fois formé, l' $^1\text{O}_2$ peut réagir avec différents composants à l'intérieur et autour du PSII (Krieger-Liszkay, 2005 ; Asada, 2006 ; Krieger-Liszkay et al., 2008 ; Fischer et al., 2013).

D'autres ROS peuvent se former, cette fois-ci en profitant des fuites d'électrons tout le long de la PET. Le radical $\text{O}_2^{\cdot -}$ par exemple est majoritairement produit au niveau du PSI. Si la majeure partie des électrons est transférée, rapidement, du centre réactionnel P700 réduit, vers les protéines Fe-S stromales, les ferrédoxines, Fd (ces protéines hydrosolubles sont de puissants réducteurs (Fig.5 ; Asada, 2006)), une partie du flux d'électrons peut être dérivée par la ferrédoxine vers l'oxygène. L' $\text{O}_2^{\cdot -}$ peut aussi être produit au niveau du pool des plastoquinones (Fig. 5). La réduction de l'oxygène par un radical cation plastosémiquinone, $\text{PQ}^{\cdot +}$ produit de l' $\text{O}_2^{\cdot -}$. En outre, dès sa production, l' $\text{O}_2^{\cdot -}$ peut être réduit par la plastohydroquinone, PQH_2 en H_2O_2 (Fig. 5 ; Mubarakshina et Ivanov, 2010 ; Baniulis et al., 2013). L' $\text{O}_2^{\cdot -}$ peut aussi être dismuté en H_2O_2 par des SODs chloroplastiques à savoir les Fe-SOD et les Cu/Zn-SOD (Fig. 5 ; Alscher et al., 2002 ; Corpas et al., 2006).

I.2.1.1.3. ROS dans les mitochondries

Dans les mitochondries, les ROS sont principalement produites par la chaîne de transport des électrons qui se déroule dans sa membrane interne (Huang et al., 2016). Cette chaîne, aussi appelée chaîne respiratoire, fait partie du processus de phosphorylation oxydative, la dernière étape de la voie de la respiration aérobie (Fig. 6 ; Buchanan et al., 2000 ; Mignolet-Spruyt et al., 2016). Les ROS sont la conséquence de la fuite d'électrons provenant de certains composants de cette chaîne respiratoire.

Les deux principaux sites de production de $\text{O}_2^{\cdot -}$ sont les Complexes I et III (Navrot et al., 2007 ; Blokhina et

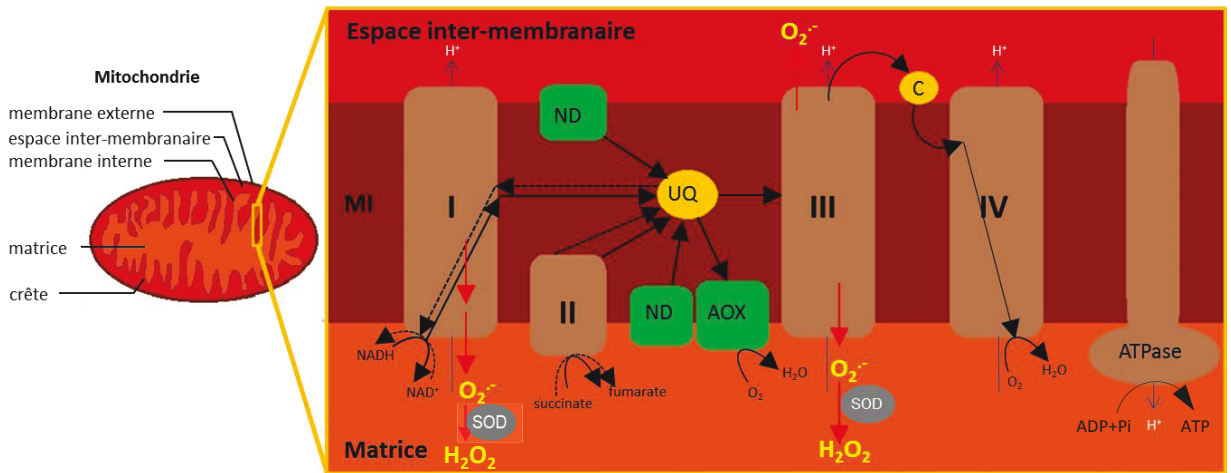


Figure 6 : Site de production des ROS au niveau de la chaîne de transfert d'électrons respiratoire, RET

La chaîne de transfert d'électrons respiratoire assure un transfert de protons et/ou d'électrons (Horton et al., 1994) et met en jeu plusieurs complexes protéiques, localisés dans la membrane interne des mitochondries. Ces complexes protéiques sont : le complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase), le complexe II (succinate-coenzyme Q oxydoréductase), le complexe III (coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase) et le complexe IV (cytochrome c oxydase). En outre, à la différence des composants de la chaîne respiratoire chez les animaux, des enzymes supplémentaires spécifiques existent pour la chaîne respiratoire chez la plante. Ce sont les NAD(P)H déshydrogénases ou ND, interne et externe et l'oxydase alternative ou AOX (représentation simplifiée ; Horton et al., 1994 ; Vanlerberghe, 2013). Le transfert d'électrons (représenté par des flèches noires pleines) établit un gradient électrochimique de protons (Flèches bleues). Ce gradient est, par la suite, utilisé pour la synthèse d'ATP source d'énergie pour la cellule, grâce à l'ATPase.

MI, membrane interne de la mitochondrie ; flèches noires en pointillées, transport inverse des électrons de la RET ; flèches rouges, formation des ROS ; SOD, superoxyde dismutase. Schéma modifié à partir de Navrot et al, 2007 ; Blokhina et Fagerstedt, 2010 et Vanlerberghe, 2013 (stœchiométries non respectées).

Fagerstedt, 2010) où l'état de réduction de l'ubiquinone joue un rôle important. L'ubiquinone (UQ, Fig. 6), qui est un petit transporteur liposoluble d'électrons et de protons situé, lui aussi, dans la membrane interne de la mitochondrie, sert de point de régulation de la production de $O_2^{\cdot-}$ dépendante de la RET (Navrot et al., 2007 ; Blokhina et Fagerstedt, 2010). Une sur-réduction du pool de l'ubiquinone conduit à un transport inverse de la RET (flèche en pointillée, Fig. 6) et la libération de $O_2^{\cdot-}$ dans la matrice mitochondriale au niveau du Complexe I (flèches rouges, Fig. 6). Au niveau du Complexe III, l'état sur-réduit du pool de l'ubiquinone provoque un transfert direct d'électron sur l' O_2 et conduit à la formation d' $O_2^{\cdot-}$ (flèches rouges, Fig. 6). Cette production d' $O_2^{\cdot-}$ du Complexe III, peut se faire d'un côté comme de l'autre de la membrane interne de la mitochondrie (flèches rouges, Fig. 6).

La réduction partielle de l' O_2 par le Complexe II a été également démontrée chez les plantes ; néanmoins, la participation de ce Complexe dans la production d' $O_2^{\cdot-}$ semble être mineure (Turrens, 2003 ; Andreyev et al., 2005, 2015). Comme des Mn-SOD ont été trouvées dans les mitochondries, ces dernières peuvent dismuter l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (Alscher et al., 2002 ; Corpas et al., 2006). Puis une chaîne de réduction monovalente permet la formation de $\cdot OH$ (Fig. 3.E ; Navrot et al., 2007 ; Blokhina et Fagerstedt, 2010 ; Vanlerberghe, 2013). Il est également à noter que l'étude de Mor et al. (2014), a rapporté la possible formation de l' $^1O_2$, dans les mitochondries indépendamment de la lumière, cependant comme dit précédemment, ce mécanisme reste à élucider.

I.2.1.1.4. Peroxysomes, sites importants de formation de H_2O_2

Les peroxysomes constituent également un des sites majeurs de production des ROS (del Río et López-Huertas, 2016) essentiellement du H_2O_2 . En conditions normales de culture (sans stress), à la lumière, on estime que la production de H_2O_2 peroxysomale est de 2 fois plus élevée que celle dans les chloroplastes et 50 fois plus élevée que celle dans les mitochondries (Foyer et Noctor, 2003 ; 2016). Cette production est liée à diverses voies métaboliques (Fig. 7 ; Mhamdi et al., 2012 ; Sandalio et Romero-Puertas, 2015 ; del Río et López-Huertas, 2016). Par ordre décroissant en terme de quantité de H_2O_2 produit, ce sont principalement : la réaction photorespiratoire via la GOX, la β -oxydation des acides gras via l'acyl-CoA oxydase, les réactions enzymatiques d'autres oxydases et la dismutation spontanée ou enzymatique des radicaux $O_2^{\cdot-}$ (Fig. 7 ; Foyer et al., 2009; del Río et López-Huertas, 2016).

La photorespiration est un processus dépendant de la lumière qui se traduit par l'absorption d' O_2 et la libération de CO_2 . Elle est compartimentée dans les chloroplastes, les peroxysomes et les mitochondries (Foyer et al., 2009). Vu la rapidité de la photorespiration, la glycolate-oxydase, enzyme exclusivement peroxysomale est parmi les principales sources de H_2O_2 dans les tissus photosynthétiques des plantes C_3 (Figs. 4 et 7 ; Foyer et Noctor, 2003). La GOX oxyde le glycolate en glyoxylate et utilise l' O_2 comme accepteur final d'électrons (Fig. 7). Le génome d'*Arabidopsis* contient cinq gènes annotés comme glycolate oxydases (*GOX1*, *GOX2*, *GOX3*, *HAOX1* et *HAOX2*). Une étude récente sur des mutants *Atgox* a montré que *GOX1* est l'isoforme principale qui métabolise le glycolate et qui produit du H_2O_2 au niveau des feuilles (Kerchev et al., 2016). L'absence de *GOX1* provoque une accumulation du niveau de glycolate et une atténuation du phénotype de mort cellulaire des

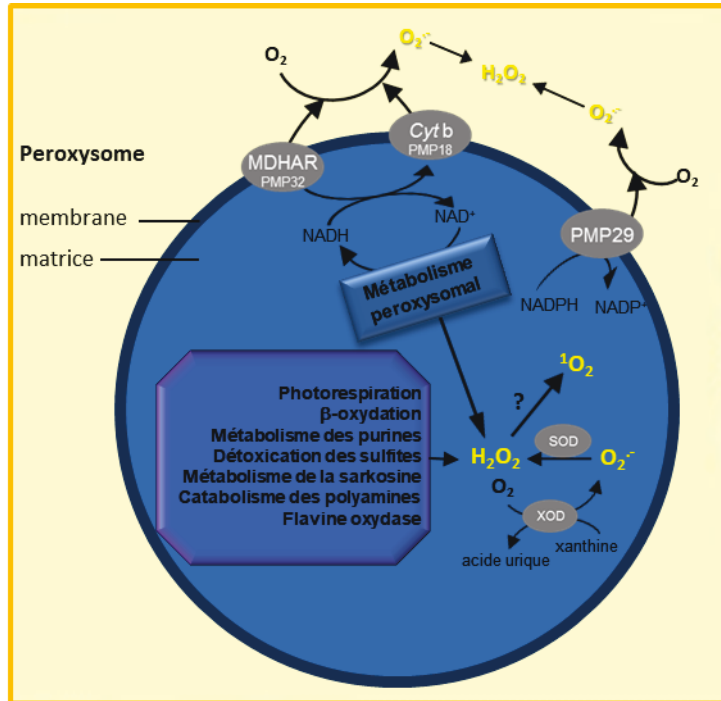


Figure 7 : Production des ROS dans les peroxysomes

Schéma des différentes sources de ROS, O₂^{•-}, H₂O₂ et ¹O₂, dans les peroxysomes végétales. PMP, protéines membranaires peroxysomales. Cyt b, un cytochrome de type b (PMP18). MDHAR, monodehydroascorbate (PMP32). PMP29, protéine membranaire peroxysomale de 29 kDa, probablement liée à la NADPH : cytochrome P450 reductase. SOD, superoxyde dismutase. XOD, xanthine oxydase. Schéma modifié à partir de Del Río et al., 2006 ; Sandalio et Romero-Puertas, 2015 et Del Río et López-Huertas, 2016 (stœchiométries non respectées).

mutants *cat2* (ce sont des mutants conditionnels qui seront développés dans la Section I.3.1.2) dans des conditions photorespiratoires (Kerchev et al., 2016). Brièvement, l'absence de catalase peroxysomale (CAT2) chez les mutants *cat2* entraîne une perturbation de l'homéostasie redox et la formation de mort cellulaire dans des conditions favorisant la photorespiration (Queval et al., 2007). Étant donné que la plus grande partie de H_2O_2 dans les feuilles est générée par l'activité GOX, le phénotype photorespiratoire atténué des mutants *cat2* en l'absence de GOX1 peut s'expliquer par une production limitée en H_2O_2 (Kerchev et al., 2016).

L'acyl-CoA oxydase de la β -oxydation des acides gras est aussi une enzyme source de H_2O_2 dans les peroxysomes (Fig. 7). Elle catalyse l'oxydation de l'acyl-CoA en *trans*- Δ^2 -énoyl-CoA, avec formation de H_2O_2 comme sous-produit (Kaur et al., 2009). Tout en étant omniprésente dans tous les tissus verts, la β -oxydation des acides gras est plus active pendant la germination des graines. D'autres fonctions, dans tous les tissus, autres que les tissus de stockage, sont associées à cette voie métabolique, telles que la synthèse de l'acide benzoïque, la biotine et les isoprénoïdes (Hu et al., 2012 ; Linka et Theodoulou, 2013 ; Cassin-Ross et Hu, 2014). La β -oxydation des acides gras est également impliquée dans le métabolisme des phytohormones telles que l'acide jasmonique (JA) et l'auxine (Nyathi et Baker, 2006). Les peroxysomes contiennent de nombreuses autres oxydases, impliquées dans d'autres voies métaboliques, produisant du H_2O_2 : la sulfite oxydase, la sarcosine oxydase et les enzymes du catabolisme des polyamines (la diamine-oxydase et la polyamine-oxydase ; Fig. 7 ; Goyer et al., 2004 ; Kamada-Nobusada et al., 2008 ; Corpas et al., 2009 ; Osno et al., 2012 ; Planas-Portell et al., 2013). En outre, la dismutation spontanée du radical $O_2^{\bullet-}$, ou enzymatique catalysée par des Cu/Zn-SOD ou par des Fe-SOD est une autre source de H_2O_2 (Figs. 4 et 7 ; Alscher et al., 2002 ; Corpas et al., 2006 ; Sandalio et al., 2013).

Outre la présence de H_2O_2 dans les peroxysomes, des études par une approche de biochimie et de spectroscopie par résonance de spin électronique, RSE, ont mis en évidence la présence d' $O_2^{\bullet-}$ dans les peroxysomes (Sandalio et al., 1988 ; del Río et al., 1989 ; 2002 ; del Río et Donaldson, 1995). La RSE désigne la propriété des électrons non-appariés à absorber de l'énergie avec changement de spin. Au moins deux sites majeurs de génération de l' $O^{\bullet-}$ ont été identifiés dans les peroxysomes (Sandalio et al., 1988 ; del Río et al., 1989 ; 2002 ; del Río et Donaldson, 1995). L'un dans la matrice peroxysomale, dont le principal système de production est assuré par la xanthine oxydase (XOD) et l'autre site, dépendant du NADH ou du NADPH, se situe dans les membranes de ces organites (Figs. 4 et 7 ; Sandalio et al., 1988 ; del Río et al., 1989 ; 2002 ; del Río et Donaldson, 1995).

La xanthine oxydase, impliquée dans le métabolisme de l'azote, catalyse l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine en acide urique et est un producteur bien connu de radicaux $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 7 ; Halliwell et Gutteridge, 2015). Les xanthine-oxydoréductases, les XORs, sont présentes sous deux formes, en fonction de leur accepteur d'électrons. D'abord la xanthine déshydrogénase, XDH qui utilise du NAD^+ , et la xanthine oxydase, XOD qui elle, utilise l' O_2 pour produire de l' $O_2^{\bullet-}$ (Figs. 4 et 7). De plus, des expériences d'incubation de matrices peroxysomales de feuilles de pois (*Pisum sativum*), avec des XORs microbiennes, ont montré que des endoprotéases peroxysomales (EPs) peuvent effectuer la conversion irréversible de XDH en XOD capable de générer des $O_2^{\bullet-}$ (Distefano et al., 1999 ; Palma et al., 2002). La présence de XODs dans les peroxysomes

végétaux a été confirmée en microscopie électronique en transmission via un immunomarquage de ces enzymes par des billes d'or (Corpas et al., 2008). En outre, l'urate-oxydase est également présente dans la matrice peroxysomale. Elle peut produire de $\text{l'O}_2^{\bullet}$. Cependant, contrairement aux signaux, obtenus via l'approche de spectroscopie par RSE, sur la production d' $\text{l'O}_2^{\bullet}$ par la XOD, ceux de l'urate oxydase sont plus faibles (Sandalio et al., 1988). La sulfite-oxydase peut aussi s'ajouter à la liste des enzymes impliquées dans la production d' $\text{l'O}_2^{\bullet}$ dans les peroxysomes (Byrne et al., 2009 ; Sandalio et Romero-Puertas, 2015). Cette production est associée à la détoxication du sulfite et à la réduction du sulfate. Cependant, la fonction de cette enzyme dans les peroxysomes n'est pas clairement établie.

Le deuxième site majeur de formation d' $\text{l'O}_2^{\bullet}$ est dans la membrane, où une petite chaîne de transport d'électrons semble être impliquée pour la génération de ce radical (Fig. 7 ; Sandalio et al., 1988 ; del Río et al., 1989 ; 2002 ; del Río et Donaldson, 1995). Trois protéines membranaires peroxysomales (PMP) ont été caractérisées pour ce transport : la PMP18, 29 et 32. Les nombres qui suivent chaque PMP, correspondent à leur masse moléculaire (Fig. 7 ; López-Huertas et al., 1999 ; del Río et al., 2002 ; del Río, 2013). La PMP 18-kDa est la principale productrice d' $\text{l'O}_2^{\bullet}$ et est identifiée comme étant un cytochrome b, *Cyt b* (Fig. 7 ; López-Huertas et al., 1999). Alors que les PMPs 18 et 32-kDa utilisent le NADH comme donneur d'électron pour la production d' $\text{l'O}_2^{\bullet}$, la PMP 29-kDa utilise le NADPH pour réduire le cytochrome c (López-Huertas et al., 1999 ; del Río et al., 2002). Le PMP 32-kDa semble correspondre à la monodéhydroascorbate réductase ou MDHAR (Fig. 7 ; López-Huertas et al., 1999), une des enzymes de la voie ascorbate-glutathion (voir dans la Section I.2.4.2). D'après del Río et al., 1990 ; 1992 et del Río et Donaldson, 1995, la production d' $\text{l'O}_2^{\bullet}$ par les membranes peroxysomales peut être une conséquence obligatoire de la ré-oxydation du NADH par la chaîne de transport d'électrons. Cette ré-oxydation permettrait de régénérer du NAD^+ qui est réutilisé dans divers processus métaboliques se déroulant dans le peroxysome. La formation de l^1O_2 indépendamment de la lumière suscitée (vue dans la Section I.2.1) d'après Mor et al. (2014) est également illustré sur la Fig. 7.

I.2.1.2. Caractéristiques chimiques des ROS

D'un point de vue purement chimique, les ROS, une fois formées (Figs. 3 et 4), peuvent réagir avec les macromolécules des cellules tels que l'ADN, les lipides, les protéines (del Río et López-Huertas, 2016 ; Bratt et al., 2016 ; Mignolet-Spruyt et al., 2016). Les ROS se différencient les uns des autres en fonction de leurs propriétés chimiques, leurs réactivités et leurs cibles (Bailey-Serres et Mittler, 2006 ; Vaahtera et al., 2014 ; Halliwell et Gutteridge, 2015). Le $\text{OH}^{\bullet}$, par exemple, avec une demi-vie de seulement 1 ns (Fig. 3.E), représente la ROS la plus instable. Il réagit rapidement avec toutes sortes de composants cellulaires. Le $\text{OH}^{\bullet}$ oxyde les acides nucléiques au niveau de l'ADN nucléaire, mitochondrial ou chloroplastique, provoquant une cassure au niveau des sucres et des bases (Henle et al., 1996), ou encore une mutation au niveau des bases guanine et thymine (Kumar et al., 2011). l^1O_2 est assez similaire au radical $\text{O}_2^{\bullet}$ en termes de stabilité, avec une demi-vie de 1 μs (Halliwell et Gutteridge, 2015). Néanmoins, ils varient considérablement dans leur spécificité de cibles : le radical $\text{O}_2^{\bullet}$ interagit principalement avec les protéines. Il oxyde la chaîne peptidique et la fragmente entraînant ainsi un clivage de la protéine (Garrison, 1987). Il peut aussi entraîner des modifications post-transcriptionnelles des acides aminés soufrés, la méthionine et la cystéine (Stadtman et al., 2002). l^1O_2 peut oxyder des acides gras

polyinsaturés, les acides linoléiques (C18 : 2) et linoléniques (C18 : 3) entraînant une diminution de la fluidité et de l'étanchéité des membranes et affecter les protéines transmembranaires, il altère ainsi les chaînes de transfert d'électrons (voir dans la Section I.2.1.1.2 ; Asada 2006 ; Triantaphylides et al., 2008 ; Triantaphylidés et Havaux 2009). En revanche, le H_2O_2 est beaucoup plus stable (temps de demi-vie de 1 ms) et peut s'accumuler à des concentrations relativement élevées (seraient de l'ordre du μM , voir du mM selon certains auteurs ; Cheeseman, 2006 ; Moller et al., 2007). Il peut réagir avec diverses grandes structures moléculaires comme les polysaccharides, les lipides membranaires et les protéines (Kirkland., 1991). A concentration élevée, le H_2O_2 peut inhiber l'activité photosynthétique (Kaiser, 1979). Quant aux RNS, le $\cdot NO$, par exemple, peut interagir avec différents composés cellulaires tels que les protéines ou d'autres radicaux ROS (Correa-Aragunde et al., 2015).

I.2.2. Fonctions des ROS dans la plante

Si les propriétés chimiques des ROS les présentent comme des sous-produits toxiques du métabolisme aérobie, de nombreuses études montrent aujourd'hui que les ROS sont des régulateurs clés de la croissance, du développement et des voies de défense des plantes (Torres et Dangel, 2005 ; Gapper et Dolan, 2006 ; Considine et Foyer, 2014 ; Kaya et al., 2014 ; 2015 ; Schippers et al., 2016 ; Tsukagoshi, 2016).

I.2.2.1. Régulation des processus de développement par les ROS

Les ROS sont impliquées dans plusieurs processus de développement tout au long de la vie d'une plante. Elles jouent un rôle essentiel dans la levée de dormance et la germination (Oracz et al., 2007 ; 2009 ; Bailly et al., 2008 ; Leymarie et al., 2012). En effet, des études l'ont démontré. Aussi bien chez *Arabidopsis* (Leymarie et al., 2012) que chez le tournesol (Oracz et al., 2007 ; 2009), un test de germination des graines dormantes, après traitement au H_2O_2 ou au méthylviologène, montre le même taux de germination retrouvé chez des graines non dormantes. Les ROS peuvent également contrôler le développement via la régulation de la croissance cellulaire. Elles jouent un rôle dans les parois cellulaires. Elles permettent leur étirement (Dunand et al., 2007, Cona et al., 2006), leur relâchement, une étape clé pour permettre l'élongation (Liszkay, van der Zalm et Schopfer 2004 ; Cosgrove, 2016) et l'arrêt de leur croissance (Kärkönen et Kuchitsu 2015). Pendant la germination, par exemple, la production des ROS déclenchée par les NADPH oxydases font intervenir ces processus dans la rupture de l'endosperme (Muller et al., 2009) et l'émergence de la radicule (Singh et al., 2015). En outre, au cours du développement de la plante, les ROS sont également impliquées dans la croissance des racines au niveau des poils absorbants (Schippers, Foyer et van Dongen 2016 ; Tsukagoshi, 2016) ainsi que dans la croissance des cellules des organes reproducteurs, au niveau des tubes polliniques (Kaya et al., 2014). Toutes ces études montrent un rôle clé des ROS dans le développement de la plante.

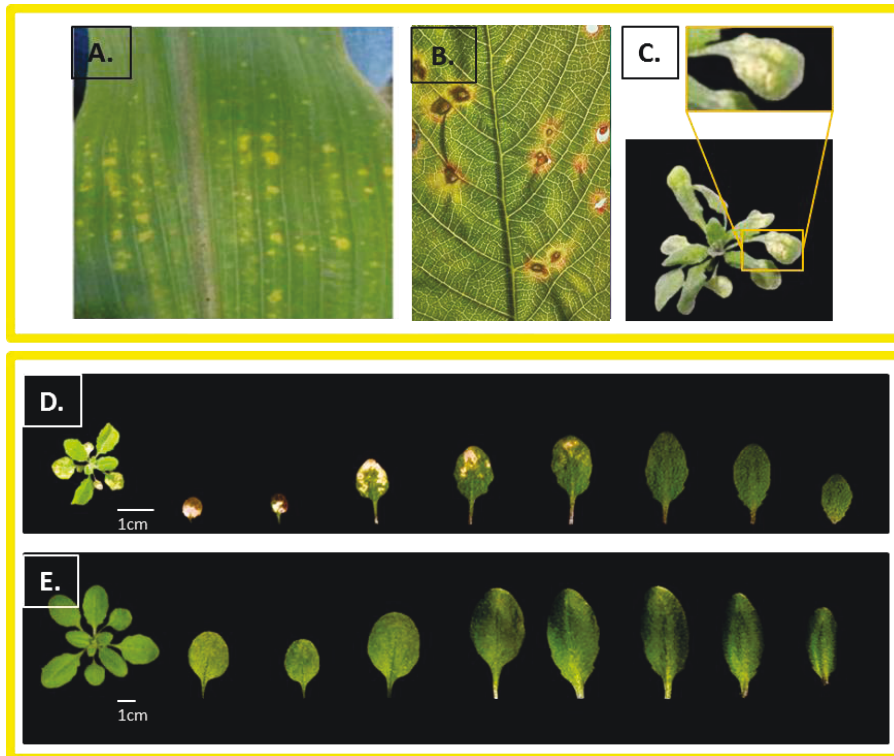


Figure 8 : Homologie phénotypique entre *cat2* et des stress abiotique et biotique

A. Photographie d'une feuille de maïs, exposée à l' O_3 (source : <http://www.inra.fr>), B. Photographie de taches nécrotiques brunes cernées d'un halo chlorotique jaune et criblures d'une feuille de cerisier, attaquée par le Chancre bactérien (*Pseudomonas syringae* pv *syringae*, source : <http://www.inra.fr>). C. Photographie d'une feuille d'*Arabidopsis thaliana*, soumise à une fumigation à l' O_3 (Dghim et al., 2013). D et E, photographies du mutant *cat2* (D) et Col-0 (E), (ma thèse de doctorat à l'IPS2 Saclay).

I.2.2.2. ROS dans la plante face aux contraintes environnementales

Face aux contraintes environnementales, des études ont montré que les ROS sont surproduites dans divers compartiments de la cellule végétale (Asada et Takahashi, 1987 ; Robinson, 1988 ; Asada, 1996 ; 1999 ; Ashraf et Harris, 2004 ; Triantaphylidès et al., 2008 ; Chawla et Jain, 2013 ; Gao et al., 2014 ; AbdElgawad et al. 2016).

I.2.2.2.1. Stress salin

Dès 1999, Asada a démontré que lors d'un stress salin, des perturbations liées à la chaîne de transport des électrons (Fig. 5) et à l'augmentation du pouvoir photo-réducteur sur l' O_2 , entraînent un excès d'énergie électrochimique au niveau du PSI (Fig. 5) générant une augmentation de la production d' $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 dans le stroma. Chez le maïs ainsi que le riz, des études ont montré qu'en condition de forte salinité, le niveau des ROS augmente dans tous les tissus (Ashraf et Harris, 2004 ; Chawla et Jain, 2013 ; AbdElgawad et al., 2016).

I.2.2.2.2. Exposition à l'ozone

Wang et al. (2016) ont montré que de par son fort pouvoir oxydant (Fig. 3.H), l' O_3 peut engendrer la production d'autres ROS tels que l' $O_2^{\cdot-}$, le H_2O_2 et l' $^{\cdot}OH$. Leurs études ont été menées sur des forêts. L'impact de l' O_3 dépend de sa concentration. Une exposition chronique à de faible concentration engendre une baisse de la photosynthèse, une inhibition de la croissance et un peu de sénescence néanmoins sans montrer de dommages visibles (Krupa, 2003). Mais à forte dose, il induit la mort cellulaire et la formation de lésions chez les plantes sensibles (Fig. 8 ; Kangasjärvi et al., 1994 ; 2005 ; Rao et al., 2000 ; Vainonen et Kangasjärvi, 2015).

I.2.2.2.3. Infection par des agents pathogènes

Quelques minutes ou heures après l'infection par des agents pathogènes, une accumulation des ROS médiée par les NADPH oxydases est observée et cette accumulation est accompagnée de symptômes nécrotiques au bout de quelques jours (exemple Fig. 8 ; Kobayashi et al., 2007 ; Wi et al., 2012).

Chez de nombreuses espèces, les NADPH oxydases sont codées par des gènes de la *respiratory burst oxidase homologue* (*Rboh*) (Torres et al., 1998 ; Marino et al., 2012). Chez *Arabidopsis*, les RBOHs constituent une famille multigénique de 10 gènes (*AtRBOHA-AtRBOHJ*). Selon l'expression des transcrits dans la plante, trois groupes ont été distingués : ceux présents dans toute la plante (*Atrboh D* et *F*), dans les racines (*Atrboh A, B, C, E, G* et *I*), et dans le pollen (*Atrboh H* et *J*) (Sagi et Fluhr, 2006; Gyan'ko et Ischenko, 2010). Les NADPH oxydases sont composées de six domaines transmembranaires, un domaine de liaison au FAD en C-terminal, et deux domaines N-terminal cytosolique ayant deux motifs *EF-hands* permettant la fixation du Ca^{2+} , dont leur activité est régulée à la fois au niveau transcriptionnel (Adachi et al., 2015) et par diverses modifications post-traductionnelles, ciblant principalement le domaine N-terminal cytosolique (Kimura et al., 2012 ; Marino et al., 2012; Baxter et al, 2014; Kadota et al, 2014).

La reconnaissance d'un agent pathogène conduit à une augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} cellulaire

ce qui permet, d'une part, de promouvoir la liaison d'ions Ca^{2+} aux motifs *EF-hands* présents sur RBOH et d'autre part de stimuler l'activité de protéines kinases calcium-dépendantes (CDPKs) et MAPKs (pour « mitogen-activated protein kinases ») qui activent cette cascade RBOH par phosphorylation. L'activation a pour conséquence la production de ROS. D'autres enzymes présentes au niveau de la paroi comme les peroxydases vont également permettre une production de H_2O_2 en réponse aux pathogènes (Daudi et al., 2012).

Cependant, l'effet le plus délétère des ROS est, qu'à forte concentration, elles déclenchent une mort cellulaire génétiquement programmée, la MCP. Le contrôle de ce mécanisme est fondamental pour la survie des organismes multicellulaires (Bruggeman et al., 2015).

I.2.2.3. ROS et mort cellulaire programmée (MCP)

Les plantes possèdent des programmes actifs de mort cellulaire génétique, ou MCP, qui font partie intégrante de leur croissance, de leur développement et de leurs réactions avec l'environnement (Gechev et Hille 2005). La MCP entraîne une dégradation sélective et active des cellules indésirables ou endommagées (Hakansson et al., 2011 ; Dwyer et al., 2012).

D'un point de vue cellulaire, la MCP chez la plante peut être classée en (1) MCP autolytique, caractérisée par la formation de grandes vacuoles lytiques et une clairance rapide du cytoplasme due à la rupture du tonoplaste et à la libération des hydrolases, et (2) en MCP non autolytiques où il n'y a pas de clairance rapide du cytoplasme (Van Doorn, 2011). La MCP autolytique se produit principalement pendant le développement de la plante, notamment au cours du développement du système racinaire (Arnaud et al., 2010 ; Fendrych et al., 2014), ou lors de la différenciation des éléments conducteurs du xylème (Escamez et Tuominen, 2014), ou encore lors de la création des formes complexes des feuilles (Gunawardena et al., 2004 ; 2005). Le taux de croissance des tissus végétaux est déterminé par l'équilibre entre la MCP et la prolifération ou l'allongement cellulaire (Van Breusegem et Dat, 2006). La MCP non autolytique, elle, est généralement observée en réponse aux stress (Pennell et Lamb, 1997 ; Lam, 2004 ; Williams et Dickman, 2008) comme pendant la réponse hypersensible (HR) induite par les agents pathogènes par exemple (Van Doorn, 2011). La HR est l'une des PCD les mieux caractérisées (Coll et al., 2011). Elle est destinée à prévenir la propagation d'une infection locale au reste de la plante en limitant la croissance et la propagation des agents pathogènes. La réponse HR se caractérise par la mort rapide de cellules voisines du point d'infection.

Il est largement documenté que les ROS ainsi que les phytohormones SA, JA et ETH sont des acteurs clés de la HR (Overmyer et al., 2000 ; Fath et al., 2001 ; De Jong et al., 2002 ; Moeder et al., 2002 ; Danon et al., 2005 ; Overmyer et al., 2005 ; Chaouch et al., 2010 ; Coll et al., 2011). En plus des phytohormones, des études ont montré que les RNS tel que le NO (Delledonne et al., 2001 ; Zago et al., 2006) et les composants lipidiques tels que les sphingolipides, les phospholipides et les oxylipines (Liang et al., 2003 ; Meijer Munnik, 2003 ; Loeffler et al., 2005) peuvent interagir avec les ROS pour moduler la MCP. En outre, des métacaspases et des métabolites, tel que le myo-inositol, sont également impliqués avec les ROS dans la MCP (He et al., 2008 ; Chaouch et Noctor, 2010, Bruggeman et al., 2015).

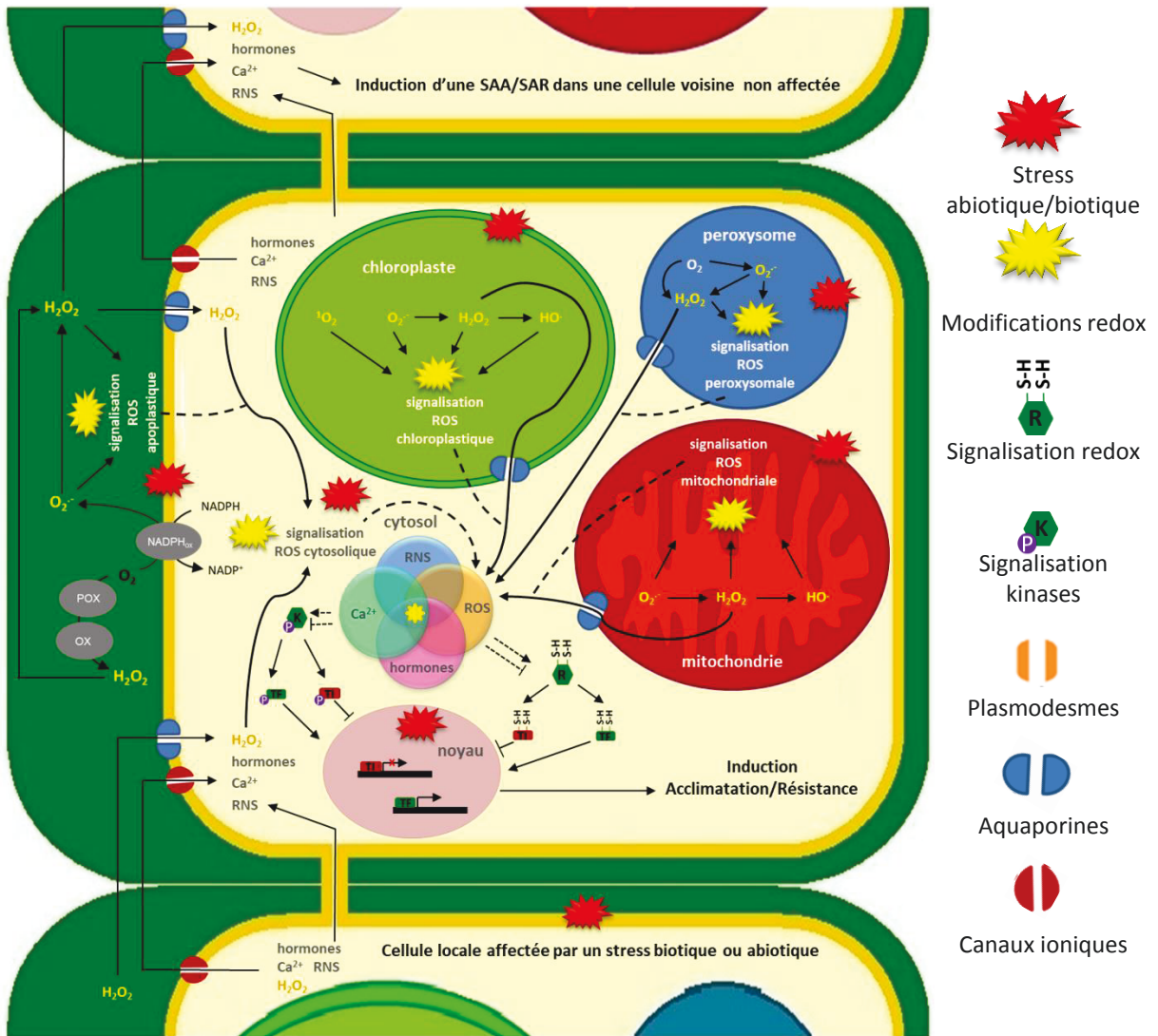


Figure 9: Schéma simplifié de l'intégration de plusieurs voies de signalisation ROS dans les cellules végétales et diffusion de cellule en cellule du signal ROS

La ROS la plus relativement stable, le H₂O₂, peut se déplacer via les aquaporines (pore bleu) pour altérer les états redox des compartiments dans lesquels il est d'abord principalement produit surtout en situation de stress (étoile rouge), puis les états redox du cytosol et du noyau. Cela pourrait impliquer des modifications redox des interactions protéine-protéine ou des messagers secondaires (étoile jaune). En finalité, l'expression des gènes est modifiée par régulation (par modification redox, ou phosphorylation) de l'activité de facteurs de transcription, TF (carrés verts) ou d'inhibiteurs de transcription, TI (carrés rouges). Schéma inspiré des travaux de Gilroy et al., 2016 ; Mignolet-Spruyt et al., 2016 et de Noctor et al., 2017 (stœchiométries non respectées).

I.2.3. ROS au cœur de la signalisation intra et intercellulaire en situation de stress

Les plantes utilisent les ROS comme seconds messagers dans les cascades de transduction de signaux dans des processus divers tels que le développement et la défense (vu dans Sections I.2.2). Les ROS elles-mêmes initient et intègrent divers réseaux de signalisation. Elles peuvent agir sur des composants de signalisation apoplastiques, avec des kinases cytosoliques, des phosphatases, diverses protéines redox-sensibles, et des facteurs de transcription (Fig. 9 ; Kovtun et al., 2000 ; Foyer et Noctor, 2013 ; Wrzaczek et al., 2013), initiant ainsi des événements de communication cellulaires, à la base des ajustements en liens avec les signaux environnementaux.

Face aux contraintes environnementales, des études ont montré une production biphasée des ROS. La première phase rapide dure quelques minutes (Soares et al., 2009 ; Nishimura et Dangl, 2010 ; Kunihiro et al., 2011 ; Mittler et al., 2011). Elle se traduit, séquentiellement, par l'augmentation d'un flux calcique vers le cytosol, la production des ROS et l'activation des MAPKs (Benschop et al., 2007 ; Miller et al., 2009 ; Finka et al., 2012 ; Stael et al., 2015). La deuxième phase est plus longue et se produit en quelques heures voire quelques jours (Soares et al., 2009 ; Nishimura et Dangl, 2010 ; Kunihiro et al., 2011 ; Mittler et al., 2011) et régulerait les changements phénotypiques tels que la croissance, le développement et assurerait la survie des cellules (Torres et al., 2005 ; Kobayashi et al., 2007 ; Muhlenbock et al., 2008 ; Wi et al., 2012 ; Dubiella et al., 2013).

Des études récentes suggèrent que cette production biphasée des ROS assure la communication entre l'initiation du burst oxydatif (terme utilisé pour désigner un pic de production de ROS) au niveau des tissus locaux (tissus principalement exposés aux différentes contraintes environnementales) et sa transmission au niveau des tissus systémiques (tissus qui ne sont pas directement exposés au stress) via un mécanisme de relais de cellule à cellule (Fig. 9 ; Miller et al., 2009 ; Suzuki et al., 2013 ; Baxter et al., 2014). Ce qui permet l'activation des mécanismes de défense ou d'acclimatation, en présence d'un stress biotique, il s'agit du SAR pour « systemic acquired resistance », et pour un stress abiotique, c'est la SAA pour « systemic acquired acclimation ».

Mais qu'en est-il de la mise en place spatiale de ces réponses à l'échelle subcellulaire ?

I.2.3.1. Acheminement du signal ROS apoplastique

La production de ROS, en particulier au niveau extracellulaire (vue dans la Section I.2.1.1.1), augmente de façon spectaculaire sous un stress environnemental (Baxter et al., 2014 ; Jaspers et Kangasjärvi, 2010 ; Miller et al., 2008 ; 2010 ; Mittler et al., 2011 ; Suzuki et al., 2012 ; Tripathy et Oelmüller, 2012 ; Wendehenne et al., 2014). Lorsque la capacité antioxydante (développée dans la Section I.2.4) dans l'apoplaste est dépassée, les ROS peuvent s'accumuler et activer des voies de signalisation spécifiques. De ce fait, les premières cellules concernées, dites « alarmantes », déclenchent des réponses de stress rapides et appropriées. Il semble bien établi que la première phase du burst oxydatif soit apoplastique. Cette phase est associée à une signalisation extracellulaire. Cette signalisation permettrait une communication de cellule à cellule pouvant déclencher des

réponses physiologiques systémiques et d'acclimatation face aux stress environnementaux (Mittler et al., 2011 ; Suzuki et al., 2013 ; Baxter et al., 2014). Malgré leur immobilité, les protéines RBOHD peuvent servir de médiateur de signalisation de longue distance via une dynamique d'auto-propagation des ROS. Tout au long de cette propagation, chaque cellule active ses propres protéines RBOHD (Miller et al., 2009 ; 2011 ; Suzuki et al., 2013 ; Baxter et al., 2014). La génération de ROS liée aux RBOH, dans les cellules adjacentes, implique probablement des mécanismes de contrôle, notamment via des CDPKs. En effet, il a été démontré que la RBOHD est une cible de phosphorylation des CPK5 *in vivo* et que cette phosphorylation l'active. La perception des ROS par la cellule voisine, où une signalisation Ca^{2+} et une CPK5 vont, à leur tour, être activées, permet ainsi la propagation de l'activation des RBOHD (Dubiella et al., 2013 ; Suzuki et al., 2013).

La production apoplastique des ROS est aussi importante pour la signalisation extracellulaire de longue distance, pour l'initiation des événements de signalisation intracellulaire ainsi que pour les changements de l'homéostasie redox cellulaire (Mittler et al., 2011). Un des procédés le mieux documenté, dans lequel les ROS extracellulaires sont impliqués dans le déclenchement des réponses intracellulaires, est la régulation des stomates. Des preuves génétiques chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, indiquent qu'aussi bien RBOHD, que RBOHF sont impliqués dans la régulation de la fermeture des stomates (Murata et al., 2001 ; Zhang et al., 2009). L'acide abscissique, ou ABA, est une phytohormone impliquée dans la fermeture des stomates en réponse à divers stress environnementaux (Mittler et Blumwald, 2015). D'après l'étude menée par Kwak et al. (2003), cette fermeture est altérée chez les mutants *rboh*f et encore plus fortement dans le double mutant *rboh*d *rboh*f. De même, une augmentation de la concentration atmosphérique en CO_2 réduit l'ouverture des stomates (Vavasseur et Raghavendra, 2005 ; Kim et al., 2010). Chater et al. (2015) ont montré que la réduction de l'ouverture stomatique provoquée à fort CO_2 dans la plante sauvage, était compromise dans le double mutant *rboh*d *rboh*f. Cependant, dans ce mécanisme, il n'est toujours pas possible de déterminer si ce sont les ROS apoplastiques qui sont actives, et perçues en dehors de la membrane plasmique, ou si c'est le H_2O_2 , qui dérive de l' $\text{O}_2^{\cdot -}$ produit par les RBOH, qui est transporté vers le cytoplasme à travers la membrane plasmique.

Le déplacement de H_2O_2 apoplastique à travers la membrane plasmique vers le cytoplasme se fait via des aquaporines (Fig. 9 ; Bienert et Chaumont, 2014 ; Bienert et al., 2014), modifiant ainsi l'état redox symplastique. Le H_2O_2 réagit avec des composants symplastiques et induit des réponses supplémentaires dans le métabolisme cellulaire et l'expression génique. Le H_2O_2 peut également diffuser de cellule en cellule à travers les plasmodesmes (Fig. 9), ou via le système vasculaire, par les cellules bordant le phloème et le xylème (Suzuki et al., 2011). En plus des signalisations apoplastiques et cytosoliques, les variations de l'accumulation des ROS sont détectées dans tous les compartiments subcellulaires via des systèmes spécifiques. A ce jour, différents systèmes percevant l'accumulation des ROS apoplastiques sont proposés, mais aucun récepteur, ou capteur n'a été identifié dans les plantes. Néanmoins, des preuves indirectes suggèrent leur existence, car divers composants apoplastiques peuvent être impliqués dans la détection des ROS (Shapiguzov et al., 2012). Il existe, par exemple, des peptides qui sont riches en cystéines, ou des protéines qui contiennent des cystéines conservées dans leur domaine extracellulaire. En effet, la fonction thiol des cystéines est une des cibles des ROS (vue dans la Section I.2.1.2). Ces cibles à cystéine(s) peuvent ainsi être utilisées comme capteurs (Wrzaczek et al., 2009 ; Murphy et al., 2012). Lühje et al. (2013) développent toute une liste de divers composants et systèmes, redox-sensibles, des

microdomaines de la membrane plasmique. En plus de cette perception membranaire des ROS apoplastiques, d'autres mécanismes, affectés par l'accumulation des ROS, pourraient transduire le signal ROS. Par exemple, les ROS provoquent des peroxydations lipidiques (Farmer et Mueller, 2013), les flux d'ions à travers la membrane peuvent être modifiés. Les ROS, peuvent aussi affecter les canaux ioniques redox-régulés (Garcia-Mata et al., 2010) causant une dépolarisation de la membrane (DeCoursey, 2003), modifiant les conformations fonctionnelles des protéines et induisant des signaux électriques (Farmer et Mueller, 2013 ; Suzuki et al., 2013 ; Wrzaczek et al., 2013.). Un nombre important de récepteurs like kinase (RLKS) sont impliqués dans la réponse des plantes face aux signaux environnementaux (Chae et al., 2009 ; Osakabe et al., 2013 ; Sierla et al., 2013 ; Kangasjärvi et Kangasjärvi, 2014). Les recherches récentes suggèrent que les ROS peuvent jouer un rôle important dans l'activation de ces récepteurs (Chae et al., 2009 ; Osakabe et al., 2013 ; Sierla et al., 2013 ; Kangasjärvi et Kangasjärvi, 2014).

Comme évoqué précédemment (dans la Section I.2.3), il existe une étroite interaction entre la signalisation ROS et la signalisation hormonale. Ces connexions peuvent être analysées via des mutants d'*Arabidopsis*. Ces mutants sont soit, des lignées transgéniques perturbées dans les voies de biosynthèses des hormones, tel que *sid2*, déficient en isochorismate synthase 1 requise pour la biosynthèse du SA ; *aos*, déficient en allene oxide synthase, impliquée dans la biosynthèse de l'acide jasmonique, JA ; *NahG*, le transgène codant pour une hydroxylase salicylate bactérienne qui dégrade le SA ; soit, des mutants impliqués dans la voie de signalisation hormonale (*ein2*, ethylene insensitive 2 ; et *coil*, coronatine insensitive 1, codant pour le récepteur de JA). Pour analyser l'interaction entre ces hormones, des mutants simples, doubles ou triples permettent l'étude de deux ou trois hormones simultanément (Kim et al., 2014 ; Xu et al., 2015). L'interaction entre la signalisation apoplastique des ROS et la signalisation hormonale a surtout été étudiée avec l' O_3 comme éliciteur. En effet, la signalisation apoplastique des ROS peut aussi être activée suite à l'exposition à l'ozone, qui pénètre dans la plante par les stomates et qui est rapidement transformé en $O_2^{\cdot-}$ et en H_2O_2 dans l'apoplaste (Vainonen et Kangasjärvi 2015). Une fumigation à l' O_3 augmente la biosynthèse de toutes les principales hormones de stress (Kangasjärvi et al., 2005). Ainsi, chez *Arabidopsis*, le traitement à l' O_3 de mutants déficients dans la voie biosynthèse et de signalisation pour trois hormones d'*Arabidopsis* à l' O_3 a révélé un modèle dans lequel le JA est un régulateur négatif de la mort cellulaire induite par les ROS apoplastiques, alors que le SA et l'éthylène sont des régulateurs positifs (Kangasjärvi et al., 2005 ; Blomster et al., 2011 ; Xu et al., 2015). L'interaction la plus importante, entre ces hormones est l'inhibition de la voie de signalisation du JA par l'éthylène, par opposition au dogme selon lequel une interaction synergique était supposée dans la signalisation pathogène (Tuominen et al., 2004 ; Kim et al., 2014 ; Xu et al., 2015). Néanmoins, en se basant sur la variation de l'expression des gènes en réponse à l' O_3 dans des mutants, incluant des mutants déficients en RBOH, il en résulte que la source et le site de production des ROS déterminent les réponses hormones-dépendantes en aval (Xu et al., 2015). Ces travaux mettent l'accent sur des spécificités liées au contexte de la signalisation ROS, avec l'activation de multiples voies de signalisation opérant en réponse aux perturbations des ROS apoplastiques.

I.2.3.2. Signalisation ROS dans les chloroplastes

Les chloroplastes peuvent répondre aux signaux ROS d'autres compartiments cellulaires (Dietz et al., 2016). Par exemple, lorsque les niveaux de ROS apoplastiques sont élevés, cette information est relayée vers les chloroplastes, par un mécanisme encore méconnu, se traduisant par une production chloroplastique accrue de ROS. Une augmentation transitoire de ROS dans l'apoplaste induit une production de ROS dans les chloroplastes des cellules de garde des stomates (Vahisalu et al., 2010). Le système flagelline 22 (flg22)/flagelline sensing2 (FLS2), de reconnaissance lié aux réponses d'immunité à la surface de la cellule, qui déclenche un burst oxydatif apoplastique de ROS nécessiterait des processus dépendants ou liés aux ROS chloroplastiques (Nomura et al., 2012 ; Göhre et al., 2012 ; Sano et al., 2014). Les changements dans les profils d'expression des gènes induits par des processus dépendants de flg22/FLS2 dans les chloroplastes ressemblent à ceux provoqués par l' $^1\text{O}_2$ (Nomura et al., 2012 ; Stael et al., 2015), ce qui suggérerait que les processus engagés dans l'apoplaste sont poursuivis par la production et la signalisation via l' $^1\text{O}_2$ dans les chloroplastes (Serrano et al., 2016).

Pour élucider quels composants des voies de transduction du signal sont déclenchés par l' $^1\text{O}_2$, le mutant fluorescent (*flu*) d'*Arabidopsis* (Meskauskiene et al., 2001) a longtemps été le système modèle d'étude de prédilection (op den Camp et al., 2003 ; Ochsenbein et al., 2006 ; Laloi et al., 2007 ; Lee et al., 2007 ; Kim et al., 2012). A l'obscurité, le mutant *flu* accumule de la protochlorophyllide, précurseur de la biosynthèse des chlorophylles, qui conduit à la production d' $^1\text{O}_2$ lors du passage à la lumière. Il s'agit d'une production massive et déclenchée artificiellement et le burst d' $^1\text{O}_2$ qui en résulte déclenche des voies menant à la chlorose et à la mort cellulaire ainsi qu'une reprogrammation profonde de l'expression des gènes nucléaires (op den Camp et al., 2003). La burst d' $^1\text{O}_2$ active également un large éventail de réponses liées aux stress biotiques et abiotiques, y compris l'induction de EDS1 (enhanced disease susceptibility) dépendant de l'accumulation de SA, et l'induction des gènes PR1 et PR5 (pathogenesis related protein ; Ochsenbein et al., 2006 ; Lee et al., 2007). Dans le noyau, la topoisomérase VI, enzyme contrôlant la conformation de l'ADN et de la chromatine, est un régulateur qui peut se lier aux promoteurs des gènes sensibles à l' $^1\text{O}_2$ et agir comme activateur des gènes régulés par l' $^1\text{O}_2$ et comme répresseur des gènes sensibles au H_2O_2 (Šimková et al., 2012). En raison de sa réactivité, et de la rapidité de sa désactivation (vue dans la Section I.2.1.2), l' $^1\text{O}_2$ ne peut pas se diffuser au-delà de l'enveloppe des chloroplastes (Asada, 2006). Néanmoins, l' $^1\text{O}_2$ peut agir comme un puissant signal rétrograde des chloroplastes vers le noyau de la cellule (Triantaphylidès et Havaux 2009 ; Laloi et Havaux, 2015). L' $^1\text{O}_2$ peut induire plusieurs voies sensibles au stress, en produisant un ensemble de messagers secondaires, tels que des espèces électrophiles réactives, des oxylipines, des peptides oxydés, et du β -cyclocitral, un dérivé oxydé volatil du β -carotène (op den Camp et al., 2003 ; Møller et Sweetlove, 2010 ; Farmer et Mueller, 2013 ; Fischer et al., 2013 ; Laloi et Havaux, 2015). EDS1 traite également les signaux liés aux $\text{O}_2^{\cdot -}$ chloroplastiques et coordonne de manière spatio-temporelle les signaux ROS chloroplastiques et apoplastiques, probablement en concert avec le SA (Straus et al., 2010).

Le rôle de la signalisation des hormones dans les chloroplastes est évident, étant donné que les biosynthèses du SA, JA, et ABA commencent toutes dans les chloroplastes. Le rôle précis des hormones dans la signalisation

ROS initiée à partir du chloroplaste a surtout été étudiée dans la transduction du signal $^1\text{O}_2$ (grâce au mutant *flu*), ou dans des expériences d'expression génique, avec des traitements qui permettent d'augmenter la production des ROS chloroplastiques (comme la forte lumière). L'augmentation de la production en $^1\text{O}_2$ chez *flu* favorise la synthèse des oxylipines, comme le JA et le *cis*-(+)-12-oxo acide phytodienoïque (OPDA) (Ochsenbein et al., 2006). La mort cellulaire dans les mutants *flu* et *chlorina1* (*chl1* ; un mutant dont les quantités réduites de Chl b mènent à une augmentation de la production d' $^1\text{O}_2$) diminue quand ils sont croisés avec des mutants déficients en JA (Danon et al., 2005 ; Ramel et al., 2013). Il est à noter que cet effet d'activation de la mort cellulaire de JA dans la signalisation $^1\text{O}_2$ est opposé au rôle protecteur du JA dans la mort cellulaire induite par les ROS apoplastiques (Kangasjärvi et al., 2005 ; Blomster et al., 2011). À la différence des rôles opposés du JA dans la transduction du signal $^1\text{O}_2$ par rapport à la signalisation des ROS apoplastiques, le rôle du SA est plus similaire en tant qu'activateur de la mort cellulaire. La dégradation du SA par l'introduction du transgène NahG ou le blocage de sa synthèse dans le mutant *sid2*, réduit la mort cellulaire, que le signal ROS soit initié dans l'apoplaste, les chloroplastes, ou les peroxyosomes (Danon et al., 2005 ; Kangasjärvi et al., 2005 ; Kaurilind et al., 2015). En forte lumière et dans le mutant *flu* l'augmentation de l'expression des gènes est liée à la fois à la voie de signalisation du SA et du JA (Ochsenbein et al., 2006 ; Tikkanen et al., 2014). Cependant, les mécanismes de signalisation déclenchés par les ROS des organites qui finalement affectent l'expression des gènes nucléaires (signalisation rétrograde) restent largement mal connus (Jaspers et Kangasjärvi 2010 ; Shapiguzov et al., 2012 ; Kmiecik et al., 2016). Contrairement à l' $^1\text{O}_2$, le H_2O_2 peut diffuser à partir de la membrane des thylakoïdes (Davletova et al., 2005 ; Mubarakshina et Ivanov, 2010) jusqu'au noyau (Borisova et al., 2012). Ce qui peut relier directement la translocation du H_2O_2 des chloroplastes au noyau via des stromules induites en réponse aux signaux redox internes (Brunkard et al., 2015) ou lors de la mort cellulaire programmée dans la HR induite par les ROS (Caplan et al., 2015).

De concert avec d'autres compartiments intracellulaires, les chloroplastes contribuent à la production de ROS lors de la HR (Yao et Greenberg, 2006 ; Liu et al., 2007 ; Zurbriggen et al., 2009 ; Stael et al., 2015). Au cours des dernières années, la participation des chloroplastes dans l'immunité de la plante a été de plus en plus étudiée (Kangasjärvi et al., 2012 ; Shapiguzov et al., 2012 ; Sierla et al., 2013 ; Serrano et al., 2016). Il est clair que, la réponse aux pathogènes diffère entre la lumière et l'obscurité (Roden et Ingle, 2009 ; Hoeberichts et al., 2013 ; Lozano-Durán et Zipfel, 2015). La reconnaissance des pathogènes déclenche une reprogrammation rapide des transcrits chloroplastiques, et certaines bactéries et éliciteurs viraux interagissent avec des protéines cibles des chloroplastes ou sont importées dans les chloroplastes (Padmanabhan et Dinesh-Kumar, 2010 ; de Torres Zabala et al., 2016).

I.2.3.3. Rôles des mitochondries dans la signalisation ROS

Des altérations dans l'homéostasie des ROS mitochondriales sont impliquées dans la communication rétrograde entre les mitochondries et le noyau (Huang et al., 2016). Chez *Arabidopsis*, cette signalisation ROS-dépendante se reflète dans l'expression élevée d'un ensemble de gènes déjà identifiés lors d'un dysfonctionnement mitochondrial (De Clercq et al., 2013). Parmi ces gènes figure celui de l'oxydase alternative 1, (AOX1 ; Vanlerberghe, 2013) connue en tant qu'intervenant caractéristique des événements de signalisation rétrograde

dans les mitochondries (Vanlerberghe, 2013). AOX1 est généralement activée sous des stress abiotiques et biotiques, plus particulièrement, les stress qui affectent le métabolisme respiratoire (Clifton et al., 2006 ; Li et al., 2013). Sous de tels stress, AOX1 peut dissiper l'excès d'énergie des électrons de la RET (Figs. 4 et 6) sous forme de chaleur (Blokina et Fagerstedt, 2010 ; Vanlerberghe, 2013). Ceci permet une prévention de la sur-réduction des composants de la chaîne de RET et de l'aggravation du stress oxydant (Van Aken et al., 2009 ; Cvetkovska et Vanlerberghe, 2012 ; 2013). Le facteur de transcription inductible par les ROS, WRKY15 réprime AOX1 en se liant à son promoteur (Vanderauwera et al., 2012). Cette répression permet probablement la croissance de la plante en conditions de stress salin et osmotique. En effet, la surexpression de WRKY15 sensibilise les plantes au stress salin, osmotique et oxydant, alors qu'elle améliore la croissance des feuilles et la production de biomasse dans des conditions optimales (Vanderauwera et al., 2012). Les ROS produites des mitochondries peuvent également affecter l'expression de plusieurs gènes ayant un motif de dysfonctionnement mitochondrial dans leur promoteur (De Clercq et al., 2013). Les gènes mitochondriaux *ANAC013* et *ANAC017* (Arabidopsis NAC domain containing protein) augmentent la tolérance contre le stress oxydant dans la plante lorsqu'ils sont surexprimés (De Clercq et al., 2013 ; Ng et al., 2013). En outre, il est connu que l'homéostasie redox de la mitochondrie (niveaux des ROS et des antioxydants) joue un rôle indispensables pour compenser un excès de la puissance réductrice de la photosynthèse, afin d'éviter des dommages oxydants au niveau des membranes des thylakoïdes des chloroplastes (évitant ainsi la fuite des électrons des chaînes de transfert ; Noguchi et Yoshida, 2008 ; Dinakar et al., 2010).

I.2.3.4. Transduction du signal ROS des peroxysomes

La photorespiration est reconnu comme la source majeure des signaux ROS lorsque les plantes sont exposées à divers stress abiotiques (Osmond et Grace, 1995 ; Wingler et al., 2000 ; Foyer et Noctor, 2009 ; Maurino et Peterhansel, 2010 ; Voss et al., 2013). Les catalases maintiennent l'homéostasie du H₂O₂ peroxysomale dans les tissus photosynthétiques (voir dans la Section I.2.4 ; Willekens et al., 1997 ; Queval et al., 2007 ; Du et al., 2008 ; Mhamdi et al., 2012). Les plantes déficientes en catalase se sont révélées être des systèmes modèles efficaces pour l'étude des réponses transcriptionnelles provoquées par l'augmentation de la production et l'accumulation du H₂O₂ peroxysomal (Dat et al., 2001 ; Vandenabeele et al., 2004 ; Vanderauwera et al., 2005 ; Queval et al., 2007, 2012). Ces réponses géniques induites par le H₂O₂ peuvent varier avec la photopériode (Queval et al., 2007). Les études transcriptomiques ont révélé que, chez le mutant *cat2*, les niveaux d'expression de plusieurs gènes liés à la défense sont augmentés, alors que l'expression de certains gènes liés aux antioxydants sont diminués (Vandenabeele et al., 2004 ; Vanderauwera et al., 2005). Un de ces gènes, rapidement et fortement induit lors du transfert du mutant *cat2* des conditions de fort CO₂ à l'air ambiant, code pour l'UDP-glucosyltransférase UGT74E2 (Vanderauwera et al., 2005). Il a été montré que sa surexpression permet d'améliorer la tolérance à la sécheresse et au sel, et de moduler la morphologie des plantes en interaction avec l'auxine (Tognetti et al., 2010). La connexion entre les ROS et l'auxine semble se rapporter à la réponse morphogénétique induite par le stress (Potters et al., 2007 ; Teotia et al., 2010 ; Blomster et al., 2011 ; Brosché et al., 2014). Le rôle joué par les hormones de stress dans le contrôle de la mort cellulaire chez le mutant *cat2* a été étudié par des approches génétiques au moyen de doubles mutants (Chaouch et al., 2010 ; Han et al., 2013a ; Kaurilind et al., 2015). Le SA et les composants de signalisation associés, y compris le nonexpressor of

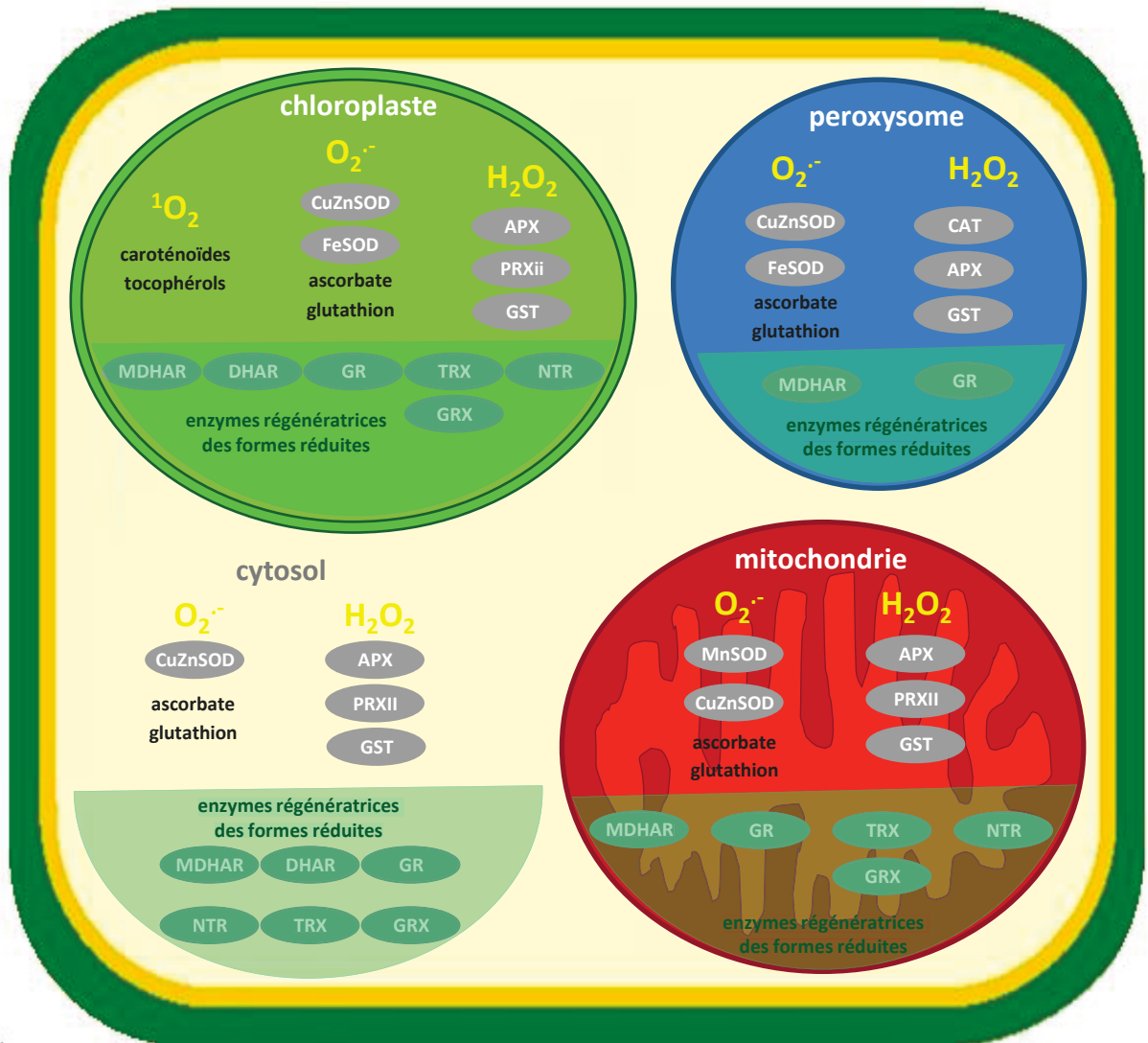


Figure 10 : Principaux systèmes antioxydants dans une cellule végétale

APX, ascorbate peroxydase. CAT, catalase. DHAR, déhydroascorbate réductase. GR, glutathion réductase. GRX, glutaredoxine. GST, glutathion S-transférase. MDHAR, monodéhydroascorbate réductase. NTR, NADPH-thiorédoxine réductase. PRXII, peroxyredoxine de type II. SOD, superoxyde dismutase. TRX, thiorédoxine. Schéma adapté de Rahantaniaina et al., 2013 et de Noctor et al., 2017 (stœchiométries non respectées).

pathogenesis-related genes 1, NPR1 et EDS1, apparaissent comme des déterminants cruciaux de la mort cellulaire chez *cat2*. L'ETH, qui est le promoteur de la mort cellulaire médiée par les ROS apoplastiques, n'a apparemment pas d'influence sur la mort cellulaire chez *cat2* (Kaurilind et al., 2015). Ces résultats renforcent l'idée de l'utilisation de différentes voies de signalisation par les ROS provenant de sources subcellulaires différentes (Sewelam et al., 2014).

Chaque organite peut gérer individuellement son état redox et, de ce fait, contribuer à l'homéostasie ROS intracellulaire (Foyer et Noctor, 2013). Les ROS, ou les intermédiaires de signalisation, sont impliqués dans la communication entre organites (Pesaresi et al., 2007 ; Kopczewski et Kuźniak, 2013). Cependant, malgré les grandes avancées de nos connaissances sur le sujet, la compréhension des mécanismes mis en jeu lors du stress oxydant dans la plante face aux contraintes environnementales reste encore limitée, surtout pour ce qui concerne les spécificités des réponses face aux différents types de contraintes. Nous avons vu que la signalisation dépendant du site d'initiation de la surproduction des ROS, semble être la clé de voute de l'émergence des concepts unificateurs. Plusieurs études récentes démontrent que la spécificité de la signalisation par les ROS, ne résulte pas seulement de leurs natures chimiques (Section I.2.1.2), mais aussi de la source même de leur production (Figs. 4-6 et 7), mais également de la façon dont se fait la transduction du signal, impliquant ou non différents compartiments subcellulaires (Bratt et al., 2016 ; Kmiecik et al., 2016 ; Mignolet-Spruyt et al., 2016).

I.2.4. Métabolisme des ROS dans la plante

L'effet des ROS sur les processus cellulaires est déterminé par un équilibre entre leur production et leur métabolisme (Fig. 10 ; Bailey-Serres et Mittler, 2006), assurée par différents systèmes dits antioxydants. Il est cependant intéressant de garder en tête qu'il peut s'agir avant tout de « systèmes de traitement des ROS » plus que de « systèmes antioxydants » proprement dits. En effet, certains composants cellulaires, en particulier les plus susceptibles d'interagir avec les ROS, peuvent transmettre les signaux oxydatifs, leurs rôles ne se cantonnant donc pas à la détoxification des ROS seulement (Noctor et al., 2017). Par exemple, comme nous le verrons plus loin (Section I.2.4), le glutathion a cette double fonction (Creissen et al., 1999 ; Han et al., 2013a).

I.2.4.1. Molécules antioxydantes

Face à la production des ROS par le métabolisme basal (Section I.2.1.1) et sa surproduction sous contraintes environnementales (Section I.2.2.2), la plante possède tout un arsenal de molécules dites antioxydantes pour les contenir et les métaboliser (Tableaux 2 et 3). Des métabolites et des enzymes peuvent être utilisés dans le contrôle de la production et l'accumulation des ROS. Pour qu'une molécule puisse être considérée comme un antioxydant efficace, son état oxydé doit être stable et de préférence recyclable. C'est le cas par exemple de l'ascorbate et du glutathion, qui, tous deux, en plus d'être abondants dans la cellule ($[\text{ascorbate}] \cong 10\text{-}100\text{ mM}$ (Noctor et Foyer, 1998) et $[\text{glutathion}] \cong 0,2\text{-}10\text{ mM}$; Mullineaux et Rausch, 2005), sont recyclables (voir la Section I.2.4.2 ; Figs. 10 et 11). En effet, le retour à une forme réduite de ces composés leur permet efficacement de continuer à interrompre ou du moins à contrôler la séquence de réactions oxydantes des ROS (Fig. 10). D'autres composés tels que les anthocyanes et la proline ont également une fonction antioxydante mais leurs

réactions avec les ROS conduisant à des modifications irréversibles nécessite leur néosynthèse (Szabados et Savouré, 2010 ; Sharma et al., 2011). C'est le cas également de certains sucres et sucres alcools qui peuvent « piéger » les radicaux $\cdot\text{OH}$ (Smirnov et Cumbe, 1989 ; Couée et al., 2006 ; Nishizawa et al., 2010).

Tableau 2 : Principales molécules antioxydantes non-enzymatiques

Molécules antioxydantes	Rôles dans la cellule de la plante	Localisations subcellulaires	Références
Caroténoïdes Carotènes Xanthophylles	Dissiper l'excès de chlorophylle triplet excitée et d' $^1\text{O}_2$ sous forme de chaleur.	Membrane chloroplastique	Grace et Logan, 1996 Verhoeven et al., 1997 Müller-Moulé et al., 2002 Ruban et al., 2012 Fischer et al., 2013
Tocophérols et tocotriénols (dérivés de la vitamine E)	Désactiver l' $^1\text{O}_2$ Stopper la propagation de la peroxydation lipidique en donnant leur hydrogène aux radicaux peroxy, $\text{ROO}\cdot$ et alcoxy, $\text{RO}\cdot$	Membrane plasmique et chloroplastique	Asada et Takahashi, 1987 Havaux et al., 2005 Dellapenna et Mène-Saffrané, 2011
Ascorbate	Désactiver l' $^1\text{O}_2$, l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ Piéger le $\cdot\text{OH}$, les $\text{ROO}\cdot$ ou les RNS, l' HClO , l' O_3 plus les autres ROS qu'ils engendrent dont le H_2O_2 . Régénérer d'autres antioxydants (tel que l' α -tocophérol) Utiliser comme cofacteur d'enzymes antioxydantes telles que les APX (Ascorbate peroxydases) qui détoxiquent le H_2O_2 .	Chloroplaste Mitochondrie Peroxisome Apoplaste Cytosol	Halliwell, 1996 Asada, 1999 Asada, 2006 Foyer et Noctor, 2011 Smirnov, 2011 Shigeoka et Maruta, 2014
Glutathion	Utiliser comme cofacteur de plusieurs peroxydases. Détoxiquer les métaux lourds Détoxiquer les herbicides et les pesticides. Régénérer l' α -tocophérol Indicateur de l'environnement redox de la cellule.	Chloroplaste Mitochondrie Peroxisome Cytosol	Noctor et al., 2012 Yu et Powles 2014 Hernández et al., 2015 Labrou et al., 2015
Flavonoïdes	Désactiver l' $^1\text{O}_2$ Piéger le $\cdot\text{OH}$, et les H_2O_2 .	Vacuole Cytosol	Tattini et al., 2000
Sucre, Sucres alcools, Anthocyanes Proline	Piéger les ROS		Smirnov et Cumbe 1989 Couée et al., 2006 Nishizawa et al., 2010 Szabados et Savouré, 2010 Sorkheh et al., 2012

Les enzymes impliquées dans la détoxification des ROS peuvent fonctionner selon deux mécanismes. D'un côté, il y a celles qui peuvent directement agir sur les ROS, comme les SOD et les catalases. D'un autre côté, des enzymes utilisent des réducteurs qui peuvent être des métabolites tels que l'ascorbate, le glutathion, ou le NADPH, ou de nature protéique, tels que les thiorédoxines (TRX) ou les glutarédoxines (GRX), pour détoxifier les ROS en les réduisant. C'est le cas des ascorbate peroxydases, APX ; des glutathion-peroxydases (GPX) ou encore des peroxyrédoxines (PRX ; Tableau 3). Compte tenu de la rapidité de réaction du radical hydroxyle (vue dans la Section I.2.1.2 et Fig. 3E), aucune enzyme n'a encore été identifiée pour le détoxifier. Ce sont les métabolites antioxydants (Tableau 2) très abondants dans la cellule végétale qui se chargent de le « piéger ». L' $O_2^{\cdot-}$ peut lui aussi être détoxiqué rapidement par ces antioxydants non-enzymatiques, mais aussi par les SOD. Les SOD assurent donc un rôle d'atténuation des ROS dans les divers compartiments cellulaires (Fig. 10). L'importance de l'action des SOD lors des stress photo-oxydatifs (Myouga et al., 2008 ; Mukherjee et al., 2014), a été montré dans la tolérance au cuivre (Singh et al., 2010) et la détoxification de l'arsenic (Sinha et al., 2005 ; 2007), mais également lors des stress biotiques, comme par exemple en réponse au champignon *Botrytis cinerea* (López-Cruz et al., 2016). Dans la littérature, des études sur les propriétés physiologiques et biochimiques des SOD abondent mais des approches de génétique moléculaire manquent encore (Gill et al., 2016). Très peu d'informations sont disponibles sur les régulations post-traductionnelles des SOD (Holzmeister et al. 2015). Il est à noter que le génome d'*Arabidopsis* code pour sept SOD : trois Fe-SOD, trois Cu/Zn-SOD et une Mn-SOD (Kliebenstein et al., 1998).

Tableau 3 : Principales enzymes de détoxification des ROS

Enzymes antioxydantes	Réducteurs	Cibles	Localisations subcellulaires	Références
Superoxyde dismutase (SOD) EC 1.15.1.1		$O_2^{\cdot-}$	Chloroplaste, Mitochondrie, Peroxysome, Apoplaste, Cytosol	Fridovich, 1986 Kliebenstein et al., 1998 Alscher et al., 2002 Scandalios, 2005
Catalase (CAT) EC 1.11.1.6		H_2O_2	Peroxysome	Willekens et al., 1997 Mhamdi et al., 2010a ; 2012
Ascorbate peroxydase (APX) EC 1.11.1.11	Ascorbate	H_2O_2	Chloroplaste Mitochondrie Peroxysome Cytosol	Jimenez et al., 1997 Raven et al., 2004 Dietz, 2016

Glutathion peroxydase (GPX) EC 1.11.1.19	Thiorédoxine (TRX) Glutathion ?	H ₂ O ₂ Peroxydes organiques Lipides peroxydés	Chloroplaste Apoplaste Cytosol	Rouhier et Jacquot, 2005 Bela et al., 2015 Dietz, 2016
Peroxyrédoxine (PRX) EC 1.11.1.15	Thiorédoxine TRX et TRX-like Glutarédoxine (GRX) Glutathion Ascorbate Cyclophilines	H ₂ O ₂ Peroxydes organiques ONOO ⁻	Chloroplaste Mitochondrie Réticulum endoplasmique Noyau Cytosol	Rouhier et Jacquot, 2005 Tripathi et al., 2009
Glutathion S-transférases (GST) EC 2.5.1.18		H ₂ O ₂	Cytosol Mitochondrie Chloroplaste Peroxisome	Wagner, Dixon et al., 2009

La catalase est une enzyme tétramérique dont chaque monomère comporte un hème avec un atome de fer en son centre, ce qui lui permet de réagir avec le H₂O₂. CAT catalyse la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂ sans nécessité d'un cofacteur. Chez la plupart des espèces végétales étudiées, la catalase est codée par trois gènes. *Arabidopsis*, par exemple, possède trois gènes : deux sont situés sur le chromosome 1 (*CAT1* et *CAT3*) et un sur le chromosome 4 (*CAT2* ; Frugoli et al., 1996). Le gène *CAT1* est principalement exprimé dans les pollens et les graines tandis que *CAT2* s'exprime dans les tissus photosynthétiques mais également dans les racines et les graines. *CAT3* est associé aux tissus vasculaires mais également aux feuilles. Les catalases sont principalement peroxysomales (Zamocky et al., 2008) car elles possèdent toutes un peptide d'adressage PTS1 pour « Peroxisomal Targeting Sequence 1 », même si ces peptides diffèrent dans leurs séquences et leurs position en C-terminale ou non. Chez *Arabidopsis* d'écotype Colombia, *CAT2* est l'isoforme majeure foliaire. Dans le mutant *cat2*, l'activité catalase est moins de 20% comparée aux plantes sauvages (voir Section I.3.1.2 ; Mhamdi et al., 2010b) et les mutants simples *cat1* et *cat3* montrent des effets beaucoup plus discrets. De plus, l'activité mesurée chez les doubles mutants *cat2 cat1* et *cat2 cat3*, est très proche de celle mesurée chez le simple mutant *cat2* (Mhamdi et al., 2010a).

La régulation de l'activité des catalases en condition de stress n'est pas encore totalement élucidée. Etant des enzymes antioxydantes, on s'attend à une augmentation de leur expression et/ou de leur activité lors d'un stress. Pourtant, il a été montré que l'activité de l'enzyme pouvait diminuer dans certaines conditions. Il a été montré que la vitesse de dégradation/renouvellement (« turn-over ») des catalases s'ajuste en fonction de la lumière (Cheng et al., 1981 ; Feierabend et Engel, 1986 ; Feierabend et al., 1996). Sous fortes lumières, le renouvellement de l'enzyme pourrait devenir limitant (Streb et Feierabend, 1996 ; Schmidt et al., 2002). Les études récentes montrent une augmentation de l'activité des CAT au cours de la sécheresse chez le blé et le millet

(Ford et al., 2011 ; Ajithkumar et Panneerselvam, 2014). L'activité des CAT augmente également en réponse à un stress salin (Mallik et al., 2011 ; Sorkheh et al., 2012) ou à l'augmentation de l'intensité lumineuse (Silva-Neta et al., 2015 ; Sofo et al., 2015).

Chez *Arabidopsis*, il a été montré que l'expression de certaines des catalases est régulée par le rythme circadien (Zhong et McClung, 1996 ; Redinbaugh et al., 1990 ; Dutilleul et al., 2003) *CAT2* étant plus fortement exprimée en début de phase lumineuse. Les similitudes des profils d'expression de *CAT2* avec des gènes de protéines directement impliquées dans la photosynthèse renforcent le rôle joué par CAT2 dans la photorespiration (Zhong et al., 1994 ; Willekens et al., 1995 ; Frugoli et al., 1996) comme une composante accessoire clé de la photosynthèse en complément de son rôle important dans la réponse des plantes au stress (Bauwe et al., 2012 ; Voss et al., 2013). Les fonctions des deux autres catalases sont moins claires. *CAT3* est annoté comme étant un gène associé à la sénescence (SEN2 ; www.tair.org). Son expression augmente avec l'âge. Cette augmentation correspondrait à une accumulation de H_2O_2 dans les tissus vasculaires (Zimmermann et al., 2006). L'abondance des transcrits de *CAT1* reste constante ou diminue en situation de stress, ou chez des mutants qui miment des lésions, tels que *lsd1* « Lesion Simulating Disease1 » et *cat2*. La participation moindre de CAT1 dans l'activité des catalases dans les feuilles (Mhamdi et al., 2010a) expliquerait ces résultats. La production d'un mutant *Arabidopsis* complètement déficient en catalase est compliquée à cause la position adjacente des gènes *CAT1* et *CAT3*. Cependant, chez le riz et d'autres espèces ces gènes sont situés sur des chromosomes différents, et la disponibilité des lignées mutantes pourrait permettre d'étudier les effets de l'absence totale en catalase dans les plantes.

La diminution de la catalase dans différentes espèces conduit à l'apparition de lésions foliaires (Smith et al., 1984 ; Willekens et al., 1997 ; Queval et al., 2007). Grâce à la facilité d'observation de ces symptômes oxydatifs, ces lignées sont des outils de compréhension des voies de signalisation impliquées dans les réponses aux stress (Chamnongpol et al., 1996 ; 1998 ; Willekens et al., 1997 ; Vandenaabeele et al., 2004 ; Vanderauwera et al., 2005 ; Queval et al., 2007, Chaouch et al., 2010 ; Han et al., 2013a ; Kaurilind et al., 2015 ; Kerchev et al., 2015 ; Noctor et al., 2015 ; Noctor et al., 2016). Il est à noter que malgré un phénotype exacerbé de *cat2* en condition normale de croissance, sa perte de fonction est non létale (Queval et al., 2007). Alors que l'accumulation de H_2O_2 est faible ou difficile à détecter dans ces lignées (Chaouch et al., 2010 ; 2012 ; Jannat et al., 2011 ; Dghim et al., 2013 ; Han et al., 2013a) leur contenu en glutathion est élevé comparé au sauvage (Han et al., 2013a) et son état redox est altéré (Queval et al., 2007). En effet, une accumulation de la forme oxydée, le disulfure de glutathion, GSSG, est caractéristique du mutant *cat2* (Smith et al., 1984 ; Willekens et al., 1997 ; Queval et al., 2007 ; Han et al., 2013a). Ces résultats suggèrent qu'en absence de CAT2, H_2O_2 ne s'accumule pas, ou peu, du fait de la présence d'autres voies de détoxification dépendantes du glutathion.

Outre les catalases, la voie ascorbate-glutathion a été très étudiée, elle est développée dans la Section qui suit. D'autres voies dépendantes du glutathion existent également (et seront développées dans l'**Article 1** : Rahantaniaina et al., 2013 ; dans la Section II.1 des résultats de mes travaux de thèse) telles que les PRX GRX-dépendantes ainsi que les glutathion-S-transférases, GST possédant une activité peroxydase. Les glutathion-peroxydases, GPX, détoxiquent également le H_2O_2 et chez les végétaux, utilisent plus efficacement la TRX que

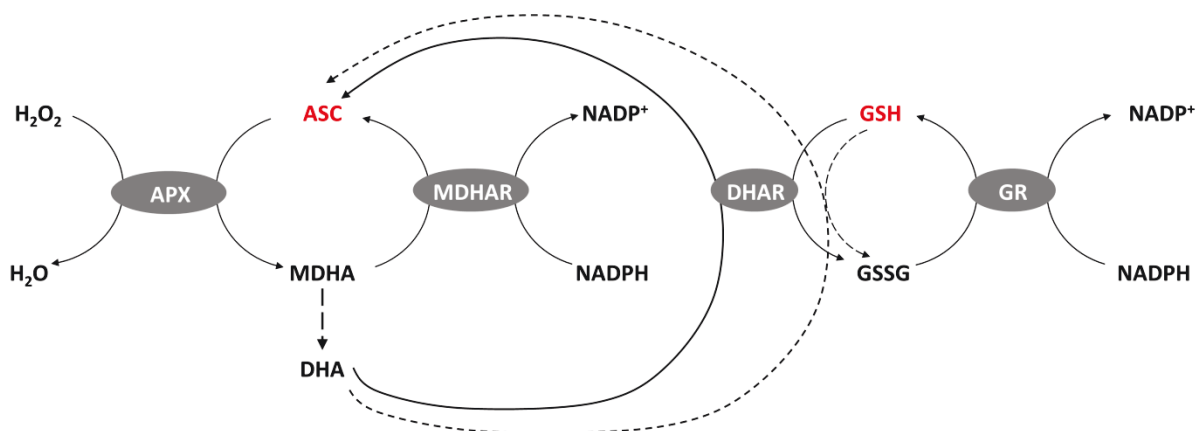


Figure 11: Voie ascorbate-glutathion

APX, l'ascorbate peroxydase, MDHAR, monodéhydroascorbate réductase, DHAR, déhydroascorbate réductase; GR, glutathion réductase; MDHA, monodéhydroascorbate ; ASC, ascorbate ; DHA, déhydroascorbate ; $NAD(P)^+/NAD(P)H$, formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) ; GSH, glutathion réduit; GSSG, glutathion oxydé disulfure. En trait plein, les réactions enzymatiques et en pointillés, celles qui sont chimiques (stœchiométries non respectées).

le glutathion comme substrat réducteur, tout comme les PRX TRX-dépendantes (Herbette et al., 2002 ; Iqbal et al., 2006 ; Navrot et al., 2006 ; Dietz, 2016).

I.2.4.2. Voie ascorbate-glutathion

Très étudié comme les catalases, la voie ascorbate-glutathion est la voie la mieux caractérisée dans le métabolisme du H_2O_2 (Fig. 11).

I.2.4.2.1. Mise en évidence de la voie ascorbate-glutathion

La découverte d'une relation étroite entre l'ascorbate et le glutathion date de juste après la caractérisation des formules chimiques de ces deux molécules (Szent-Györgyi, 1931 ; Hopkins et Morgan, 1936). La production d' H_2O_2 au niveau des thylakoïdes est aussi connue depuis très longtemps (Mehler, 1951), alors qu'il a fallu attendre les années 70 pour découvrir la présence de $O_2^{\cdot-}$ et des SOD dans les chloroplastes (Allen et Hall, 1973 ; Asada et al, 1974). Puis, comme il a été admis que les CAT sont absentes de ces organites, il est alors devenu évident que d'autres systèmes, devaient y exister afin de métaboliser le H_2O_2 produit. C'est dans ce contexte, et en se basant sur une hypothèse initiale de l'implication de l'ascorbate et du glutathion dans la détoxification du H_2O_2 , qu'il a été montré que ces deux métabolites, ainsi que des enzymes pouvant lier le NADPH, le glutathion et l'ascorbate, devaient exister dans les chloroplastes (Foyer et Halliwell, 1976, 1977).

L'identification de l'ascorbate peroxydase, APX, une enzyme liée aux thylakoïdes mais aussi soluble dans le stroma, qui utilise l'ascorbate, ASC, comme réducteur pour détoxifier le H_2O_2 , a permis de faire le lien entre l'ascorbate et du glutathion dans le métabolisme du H_2O_2 chloroplastique (Grodén et Beck, 1979 ; Kelly et Latzko, 1979). Par la suite, il a été montré que l'ASC peut être régénéré dans le chloroplaste par des mécanismes, soit dépendants de la ferrédoxine (via le cycle eau-eau qui maintient l'ascorbate sous forme réduite (ASC) et prévient l'accumulation d' $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2) soit dépendants d'enzymes telles que la MDHAR qui utilise le NAD(P)H comme co-facteur. Puis, une autre enzyme a été identifiée pour régénérer l'ASC la déhydroascorbate réductase, DHAR, qui utilise la forme réduite thiol du glutathion, GSH, comme substrat réducteur (Fig. 11 ; Asada, 1999). Enfin, la glutathion réductase, GR, permettant de régénérer le GSH à partir de sa forme majeure oxydée GSSG, en utilisant le NADPH comme pouvoir réducteur, a été identifiée (Fig. 11 ; Asada, 1992 ; 1999).

La voie ascorbate-glutathion est un mécanisme essentiel dans le métabolisme du H_2O_2 aussi bien chez les plantes que chez les animaux. Dans les cellules végétales, les composants de cette voie sont présents dans les chloroplastes, mais aussi les mitochondries, les peroxysomes ainsi que dans le cytosol (Fig. 10; Edwards et al, 1991 ; Mittler et Zilinskas, 1991 ; Jiménez et al., 1997).

I.2.4.2.2. Propriétés moléculaires et biochimiques des acteurs de la voie ascorbate-glutathion

Les APX, tout comme les CAT, sont des peroxydases à hème de classe I. Les APX utilisent exclusivement l'ascorbate comme donneur d'électrons pour réduire le H_2O_2 . Chez Arabidopsis les APX sont codées par neuf

gènes. Les isoformes APX1, 2 et 6 sont cytosoliques, APX3 et 5 peroxysomales, APX4, tAPX (APX-thylakoïdale) et sAPX (APX du stroma) sont chloroplastiques, sAPX étant doublement adressée vers les chloroplastes et les mitochondries (Chew et al., 2003 ; Narendra et al., 2006). Le gène *APX7* est probablement un pseudogène. Chez le mutant *cat2*, une diminution de l'activité des catalases est associée à une augmentation de l'activité APX foliaire (Mhamdi et al., 2010b). Sur les huit transcrits *APX*, seul *APX1* est significativement augmenté chez *cat2* après transfert de fort CO₂ vers l'air (Mhamdi et al., 2010b). Davletova et al., en 2005 ont montré l'importance cette isoforme cytosolique lors d'un stress provoqué par une forte lumière. Ils ont observé qu'une activité accrue APX est accompagnée d'une induction des transcrits de l'APX1 cytosolique en réponse à ce type de stress. De même chez le pois et l'épinard, le niveau des transcrits des APX cytosoliques est augmenté dans les feuilles en réponse à une forte lumière mais aussi à la sécheresse, à une forte chaleur et au traitement au méthyl-viologène (Mittler et al., 1992 ; Yoshimura et al., 2000). D'autres contraintes environnementales comme l'exposition à l'ozone, au Cd, aux UV, à l'hypoxie ou à l'anoxie, induisent également une augmentation de l'activité APX foliaire (Rao et al., 1996 ; Biemelt et al., 1998 ; Schutzenbudel et al., 2001). Des plantes mutantes d'*Arabidopsis* ou de riz, dépourvues d'APX chloroplastique, ne montrent aucun phénotype particulier, dans des conditions normales de culture. Par contre, leur développement est plus fortement affecté que celui des plantes sauvages quand elles sont cultivées à basse température et en présence de méthyl-viologène (Kangasjärvi et al., 2008 ; Caverzan et al., 2014). Ces travaux démontrent l'importance des APXs chloroplastiques dans des conditions de photoinhibition. A l'inverse, chez le tabac et *Arabidopsis*, des lignées transgéniques surexprimant le gène tAPX sont plus tolérantes face à un stress photo-oxydatif (une forte lumière et traitement au méthyl-viologène ; Yabuta et al., 2002 ; Murgia et al., 2004). La réduction du H₂O₂ par l'APX génère la forme oxydée de l'ascorbate monodehydroascorbate (MDHA) qui peut spontanément donner du déhydroascorbate (DHA). Les formes MDHA et DHA peuvent être réduites en ASC par l'action de réductases qui leur sont spécifiques, les MDHAR et les DHAR.

Les MDHARs sont des oxydoréductases à FAD-(flavine adénine dinucléotide), qui utilisent le NADH (K_m 5 µM) ou le NADPH (K_m 22-200 µM) comme substrat pour la réduction du MDHA (Sano et al., 1995). L'analyse du génome d'*Arabidopsis* a révélé l'existence de cinq MDHARs. Les MDHAR1 et 4 sont destinées aux matrices et aux membranes des peroxysomes, respectivement, et les MDHAR2 et 3 sont cytosoliques (Lisenbee et al., 2005). La MDHAR6 est doublement adressée aux mitochondries ou aux chloroplastes (Obara et al., 2002), et elle est abondante dans tous les tissus et à tous les stades de développement (Hruz et al., 2008). Plusieurs études ont rapporté une corrélation directe entre le niveau d'activité MDHAR foliaire et la tolérance au stress. Par exemple, chez la tomate lors d'un stress salin (Mittova et al., 2003) ou sous une intensité lumineuse élevée (Gechev et al., 2003), ou encore chez le riz lors d'une exposition à de faible température (Oidaira et al., 2000), et chez *Arabidopsis* suite à une exposition aux UV-C (Kubo et al., 1999). Une étude récente démontre qu'une lignée d'*Arabidopsis* déficiente en MDHAR6 possède une tolérance accrue au 2,4,6-trinitrotoluène (TNT ; Johnston et al., 2015) permettant par exemple d'envisager l'utilisation de telles plantes pour la dépollution (phytoremédiation) des sites pollués au TNT. Des tabacs transgéniques surexprimant le gène *AtMDAR1* montrent une tolérance accrue à l'ozone, au NaCl et au stress osmotique (Eltayeb et al., 2007). L'expression accrue de MDHAR améliore aussi la tolérance au froid des fruits chez la tomate (Stevens et al., 2008).

Les DHARs représentent une autre voie de recyclage de l'ASC. Elles catalysent la réduction du DHA en ASC utilisant le GSH comme agent réducteur (Noctor et Foyer, 1998). La DHAR joue un rôle essentiel dans le maintien du pool d'ASC (Gallie, 2012). En effet, si le DHA n'est pas recyclé, il peut subir une hydrolyse irréversible en acide 2,3-dicétogulonique (Chen et Gallie, 2006), affaiblissant ainsi le pool d'ASC. Les DHARs sont classées dans la super-famille des GSTs (Dixon et al., 2002). Chez *Arabidopsis*, cinq gènes *DHAR* sont rapportés (Vadassery et al., 2009 ; Dixon et Edwards, 2010.). Cependant, seuls trois codent pour des protéines fonctionnelles : la *DHAR1*, *DHAR2* et *DHAR3*. La Sous-partie II.2 des résultats de cette thèse apportera plus de précisions sur l'importance de ces trois isoformes notamment en situation de stress ainsi que leur localisation subcellulaire.

La plupart des processus faisant intervenir le GSH conduisent à son oxydation. Il est régénéré par la GR qui est une flavoprotéine dimérique NADPH-dépendante. La NADPH-thiorédoxine réductase, NTR, peut également réduire le GSSG (Marty et al., 2009) mais la GR est beaucoup plus efficace. Deux gènes codent pour la GR chez *Arabidopsis*. *GR1* code pour une protéine localisée dans le cytosol et les peroxysomes (Kataya et Reumann, 2010), tandis que le *GR2* code pour une enzyme doublement adressée aux chloroplastes et aux mitochondries (Chew et al., 2003). Etonnement, une surexpression de la GR, dans diverses plantes, ne conduit pas à une résistance augmentée aux stress (Foyer et al., 1991 ; Kornyejev et al., 2005). Chez le tabac une augmentation de l'activité GR cytosolique n'améliore pas la tolérance à une forte lumière ou au méthyl viologène et le statut redox du glutathion reste inchangé (GSH/GSSG ; Foyer et al., 1991). Pourtant, dans ces mêmes plantes, une augmentation du taux de réduction du pool d'ascorbate a bien été observée. Ces résultats ont montré l'importance du couplage des réactions impliquées dans la voie ascorbate-glutathion (Foyer et al., 1991). Une autre étude montre que la surexpression de la GR chloroplastique ne favorise pas des plantes de coton dans des conditions de stress (Kornyejev et al., 2005). Chez *Arabidopsis* des mutants ADN-T pour le gène *GR2*, sont embryo-létaux (Tzafrir et al., 2004), et les mutants pour le *GR1*, malgré une réduction de 30 à 60% de l'activité GR extractible, ne montrent pas d'effet phénotypique de la mutation (Marty et al., 2009 ; Mhamdi et al 2010b). Une approche génétique a montré que la nature aphenotypique des mutants *gr1* résulterait d'une compensation partielle pour la réduction du GSSG par le système NTR-TRX cytosolique (Marty et al., 2009). Cependant, Mhamdi et al. (2010b) ont prouvé que dans le double mutant, *cat2 gr1*, l'accumulation massive de GSSG est associée à un phénotype très marqué (petite taille et lésions foliaires) aggravé en comparaison à *cat2*, confirmant ainsi que le système NTR-TRX ne peut pas remplacer GR1 efficacement dans des conditions où la charge oxydative est élevée (Mhamdi et al., 2010b).

I.2.4.2.3. Couplage fonctionnel entre ascorbate et glutathion ?

Comme nous l'avons vu, la voie ascorbate-glutathion (Fig. 11) est, un système majeur pour le traitement du H_2O_2 dans les cellules végétales (Asada, 1992 ; Noctor et Foyer, 1998 ; Shigeoka et al., 2002 ; Foyer et Noctor, 2011). Cependant, malgré l'évidence que les oxydoréductases dépendantes de l'ascorbate et du glutathion, soient engagées lorsque le H_2O_2 intracellulaire est augmenté (Mhamdi et al., 2010b ; Vanderauwera et al., 2011), l'importance physiologique du couplage entre les pools de ces deux réducteurs reste à établir (Foyer et Noctor, 2011 ; discuté dans la Partie II. Résultats). La teneur en ascorbate semble plus sensible que la teneur en

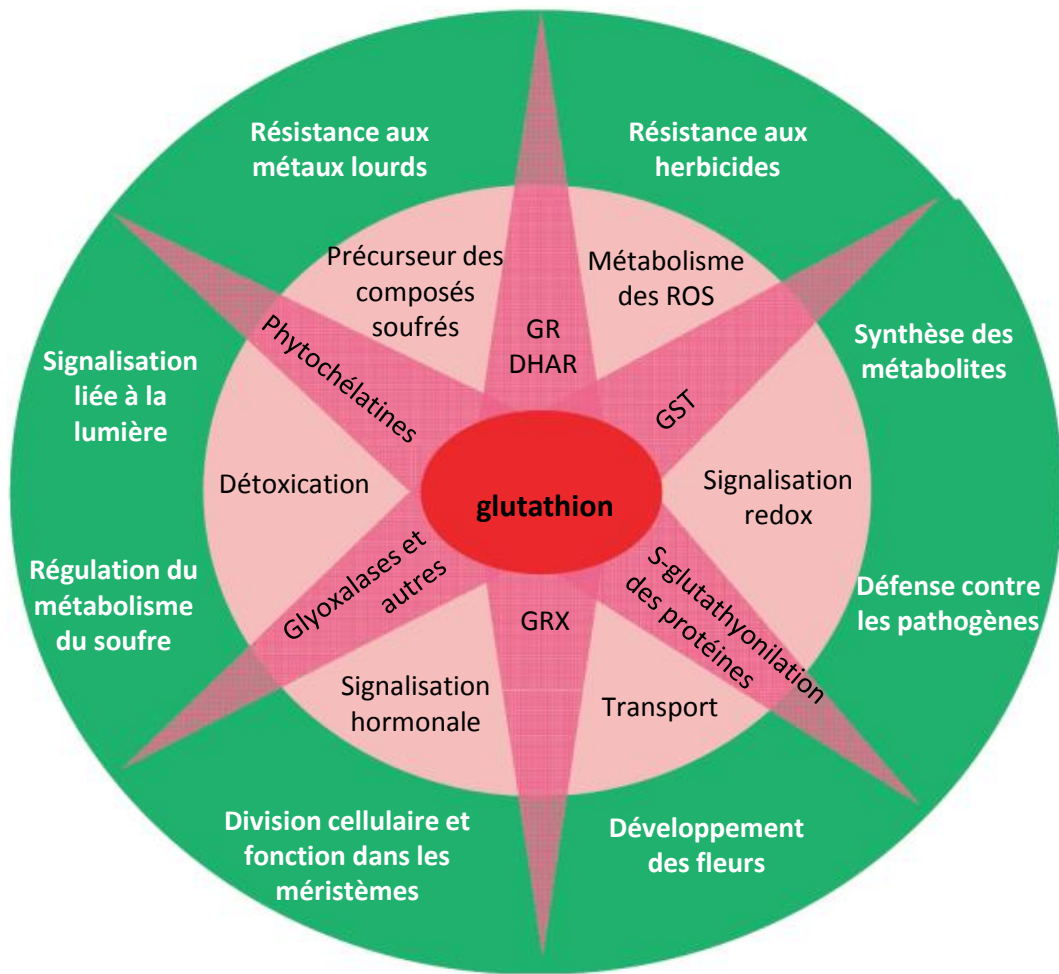


Figure 12 : Importance physiologique du glutathion

Le cercle vert extérieur montre des exemples de processus physiologiques affectés par le statut du glutathion ou par des composants dépendant du glutathion. Le cercle rose intérieur donne des exemples de fonctions biochimiques majeures du glutathion. Les rayons roses plus foncés indiquent les composants impliqués dans ces fonctions. Schéma adapté de Noctor et al., 2012.

glutathion aux facteurs liés aux variations de l'éclairement (Grace et Logan, 1996 ; Gatzek et al., 2002 ; Smirnoff, 2011). Une explication provient des études qui ont montré l'implication de l'ascorbate dans la régénération du tocophérol et dans le cycle des xanthophylles, tous deux impliqués dans la préservation de l'intégrité des composants des thylakoïdes (Tableau 2 ; Halliwell, 1996 ; Müller-Moulé et al., 2002). Chez les mutants déficients en catalase, aussi bien chez le tabac que chez *Arabidopsis*, le pool d'ascorbate est beaucoup moins affecté que celui du glutathion, même si ces travaux valident que l'APX cytosolique joue un rôle important dans le métabolisme du H_2O_2 (Rizhsky et al., 2002 ; Vanderauwera et al., 2011).

Le statut du glutathion apparaît comme un marqueur métabolique plus généraliste que celui de l'ascorbate pour évaluer les changements de l'état redox cellulaire. Une accumulation du glutathion a été observée, parfois de manière transitoire, dans diverses conditions de stress oxydant, comme celle de l'exposition à l' O_3 , au froid et aux agents pathogènes (Sen Gupta et al., 1991 ; Vanacker et al., 2000 ; Bick et al., 2001 ; Gomez et al., 2004). L'application d'un éliciteur des réactions de défense, la cryptogéine, qui induit la HR, provoque un épuisement du pool total de glutathion (Davoine et al., 2006 ; Hoeberichts et al., 2013). Consécutivement à une attaque bactérienne, virale ou fongique, la réponse hypersensible est conditionnée par une activation des gènes PR (Pathogenesis Related genes). Les changements du pool de glutathion, semblent relier fonctionnellement le H_2O_2 intracellulaire au niveau d'expression des gènes PR (Han et al., 2013a ; 2013b). De nombreuses études soulignent l'importance du rôle du glutathion dans le pilotage de la réponse des plantes aux stress biotiques (Ball et al., 2004 ; Parisy et al., 2007 ; Schlaeppli et al., 2008 ; Baldacci-Cresp et al., 2012).

I.2.5. Glutathion : molécule vitale dans la régulation redox thiol/disulfure dépendante dans la cellule

Le GSH, γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine est un tripeptide à thiol. La liaison du groupe γ -carboxyl du glutamate avec le groupe amine de la cystéine le distingue des protéines et conférerait une certaine stabilité à la molécule. C'est le résidu cystéine qui porte le groupement thiol (-SH). Le glutathion est caractérisé par deux propriétés biochimiques. Sa concentration de l'ordre du millimolaire en fait le groupement thiol le plus abondant dans les cellules (Krueger et al., 2009, Queval et al., 2011, Han et al., 2013a ; Zechmann, 2014) et son potentiel redox relativement bas lui confère un fort pouvoir réducteur (Meyer et Hell, 2005 ; Meyer et al., 2007 ; Schwarzländer et al., 2008 ; Bratt et al., 2016 ; Koprivova et Kopriva, 2016). Le glutathion est physiologiquement indispensable dans la cellule pour le maintien de l'homéostasie redox cellulaire, en intervenant dans les modifications thiols-disulfure dépendantes (Fig. 12).

I.2.5.1. Synthèse du glutathion et sa régulation

Des études génétiques moléculaires ont fourni des preuves irréfutables que le glutathion est un métabolite essentiel à la vie des plantes. Des mutants nuls dans le gène *GSH1*, qui code pour la γ -glutamylcystéine synthétase, γ -ECS, la première des deux enzymes de la voie de synthèse du glutathion (Figs. 13 et 14), ne parviennent pas à survivre au-delà du stade embryonnaire (Cairns et al., 2006 ; Pasternak et al., 2008). La γ -ECS

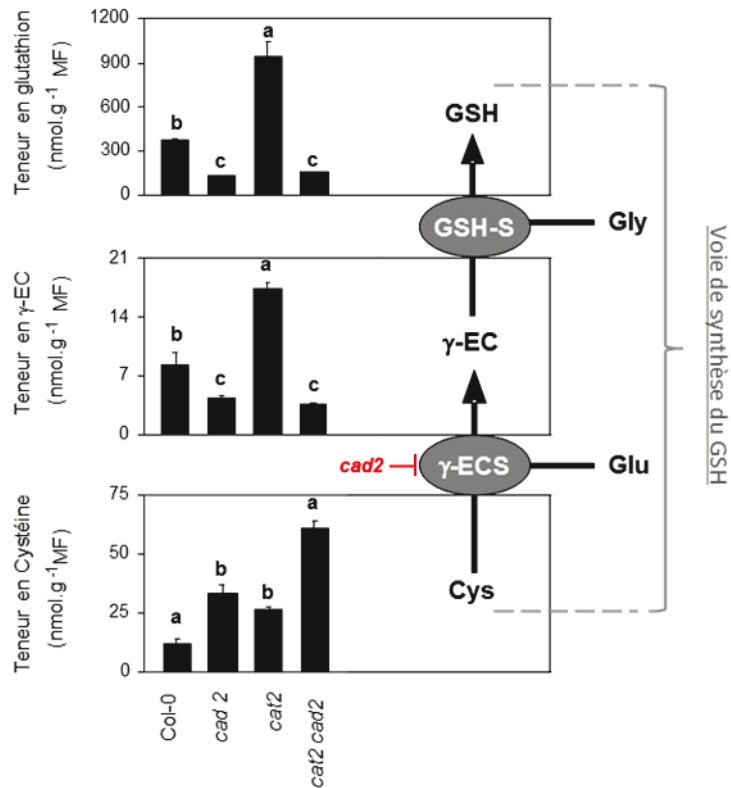


Figure 13 : Synthèse du glutathion

Cette figure est inspirée des résultats de l'article de Han et al. (2013b). Partie gauche : Profilage métabolique avec teneur foliaire en Cystéine, Cys ; en γ -glutamylcystéine, γ -EC et en glutathion, GSH chez Col-0, les mutants *cad2*, *cat2* et *cat2 cad2*. Partie droite : Schéma simplifié de la voie de la synthèse du GSH. Glu, glutamate ; γ -ECS, γ -glutamylcystéine synthétase ; Gly, glycine ; GSH-S, glutathion synthétase.

catalyse la formation de la γ -glutamylcystéine, γ -EC à partir des résidus Glu et Cys (Figs. 13 et 14). Cette réaction est ATP-dépendante et se passe dans les plastes (Rennenberg, 1982 ; Meister, 1988 ; Mullineaux et Rausch, 2005 ; Noctor et al., 2002 ; Zechmann, 2014). En outre, des mutants nuls dans le gène *GSH2*, qui code pour la deuxième enzyme, la GSH-synthétase ou GSH-S, sont incapables de dépasser le stade de plantule (Pasternak et al., 2008). L'ARN pré-messager de *GSH2* subit un épissage alternatif : le transcrit le plus long héberge un peptide signal qui cible la protéine vers les chloroplastes, et le transcrit le plus court code pour un variant cytosolique (Wachter et al., 2005). La GSH-S catalyse l'ajout d'une Gly à la γ -EC, cette réaction est également ATP-dépendante (Noctor et al., 2011).

La régulation de la synthèse du GSH peut être affectée par plusieurs facteurs comme la disponibilité en ATP et acides aminés qui le constituent (Buwalda et al., 1990 ; Noctor et al., 1997 ; Ogawa et al., 2004 ; Zechmann et al., 2008), ou encore par le niveau de transcrits de *GSH1* et *GSH2* (Xiang et Oliver, 1998 ; Sung et al., 2009 ; Shan et Liang, 2010 ; Chen et al., 2011 ; Kang et al., 2013 ; Li et al., 2013). Il semble que l'activité de la γ -ECS et la disponibilité en Cystéine soient les déterminants principaux du niveau de glutathion cellulaire. Dans des conditions non stressantes, la cystéine et la γ -EC sont les précurseurs limitants de la synthèse du glutathion. Il a été montré qu'à la fois l'ajout ou l'augmentation de la concentration en cystéine (Güllner et al., 1999 ; Harms et al., 2000 ; Bloem et al., 2004 ; 2007 ; Zechmann et al., 2007 ; 2008) mais également la surexpression des gènes et des enzymes impliquées dans la synthèse de la cystéine (Harms et al., 2000 ; Noji et Saito, 2002 ; Hatano-Iwasaki et Ogawa, 2012) conduisent à une augmentation de la teneur en glutathion chez les plantes. Le blocage, transitoire ou permanent, de la première étape de la synthèse du glutathion conduit à une accumulation de cystéine, allant jusqu'à 300% dans certains compartiments cellulaires, indiquant que le pool de cystéine est en grande partie utilisé pour la synthèse du glutathion (Koffler et al., 2011).

Plusieurs travaux ont montré une induction transcriptionnelle de *GSH1* et *GSH2* en réponse aux contraintes environnementales et aux phytohormones (Xiang et Oliver, 1998 ; Sung et al., 2009 ; Shan et Liang, 2010 ; Chen et al., 2011 ; Kang et al., 2013 ; Li et al., 2013). Cependant, la régulation de l'activité de la γ -ECS est le facteur clé de la régulation de la synthèse du GSH. En effet, dès 1990, Hell et Bergmann ont montré une sensibilité des préparations enzymatiques de γ -ECS partiellement purifiées à partir de cultures cellulaires de feuilles de tabac à l'inhibition par des thiols. Des effets similaires ont ensuite été rapportés chez d'autres espèces (Noctor et al., 2002 ; Jez et al., 2004). Un peu plus tard, en 2006, Hothorn et al., ont mis en évidence que la γ -ECS possède deux ponts disulfures intramoléculaires. Le premier pont disulfure lui confère une sensibilité à l'environnement redox cellulaire, et le second permet son homodimérisation en condition oxydante. Puis, les études ont précisé que la γ -ECS subit une double régulation : (1) une activation par l'oxydation de cystéines régulatrices et (2) une rétro-inhibition par le GSH (Hicks et al., 2007 ; Gromes et al., 2008). L'utilisation de plusieurs mutants alléliques d'*Arabidopsis* diminués pour l'expression de la γ -ECS (résumé dans le Tableau 4), a permis d'établir que ces régulations ont lieu *in planta* en situation de stress (Cobbet et al., 1998 ; Vernoux et al., 2000 ; Ball et al., 2004 ; Parisy et al., 2007 ; Shanmugam et al., 2012 ; Jobe et al., 2012). Une étude récente chez le double mutant *cat2 cad2* a confirmé que la teneur foliaire en GSH est régulée par sa synthèse (Fig. 13 ; Han et al., 2013b).

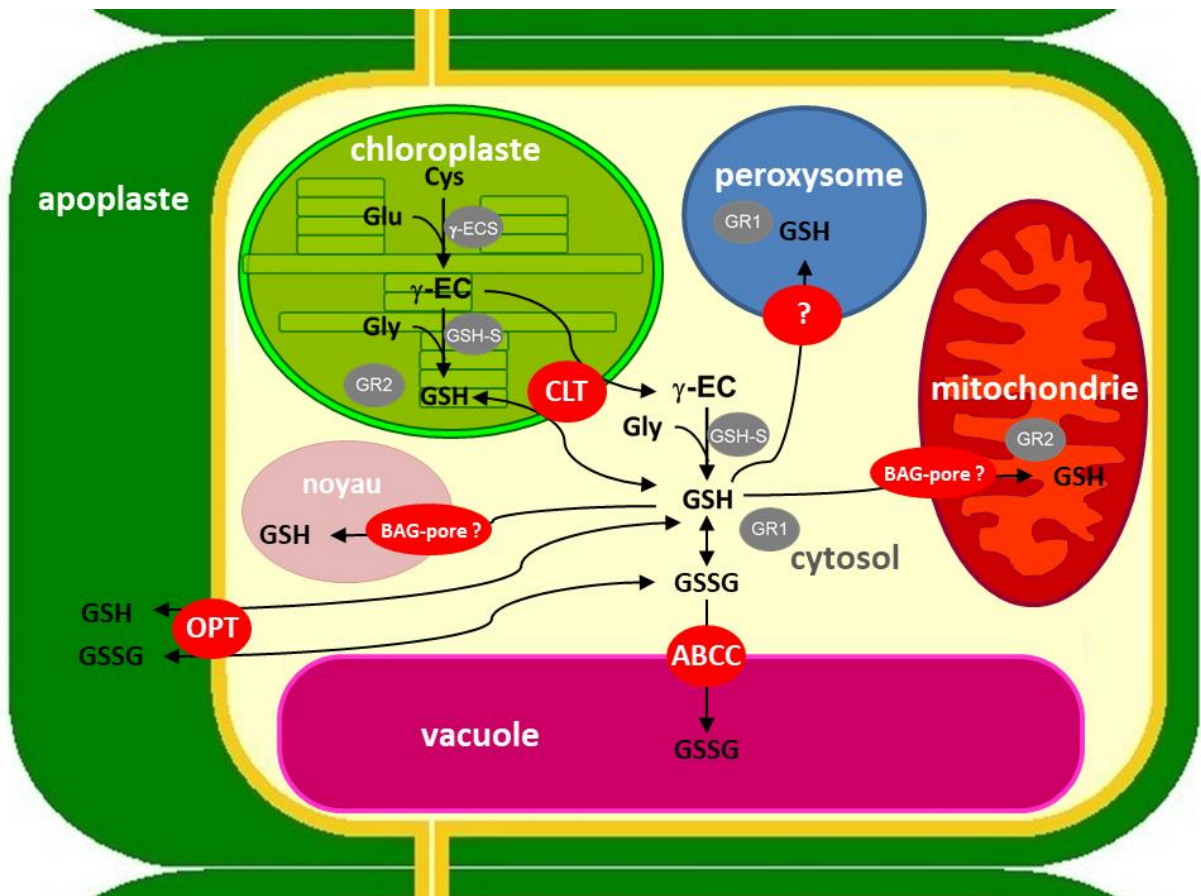


Figure 14 : Compartimentation de la synthèse, de la réduction et transport du glutathion dans une cellule végétale

Cys, cystéine ; Glu, glutamate ; γ -EC (S), γ -glutamylcystéine (synthétase) ; Gly, glycine ; GSH-S, glutathion synthétase ; GSH, forme réduite du glutathion ; GR, glutathion réductase ; GSSG, forme oxydée du glutathion (disulfure) ; CLT, « chloroquinone resistance transporter-like transporter » ; BAG, « Bcl-2-associated athanogene » ; ABCC sous-classe C des transporteurs « ATP-binding cassette (ABC) translocators » ou MRP pour « Multidrug resistance-associated protein » ; OPT, « oligopeptide transporter ».

Tableau 4 : Preuves génétiques de la régulation de la synthèse du GSH par le stress oxydant chez des mutants alléliques KD pour γ -ECS chez *Arabidopsis thaliana*

Mutants alléliques KD pour γ -ECS chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	% de GSH	Phénotype	Références bibliographiques
<i>rm1-1</i> (root-meristemless 1)	3%	arrêt de croissance racinaire	Vernoux et al., 2000
<i>cad2-1</i> (cadmium-sensitive 2-1)	30%	sensibilité accrue au Cd	Cobbet et al., 1998
<i>rax1-1</i> (regulator of APX2 1-1)	45%	inhibition de la croissance sous forte lumière	Ball et al., 2004
<i>pad2-1</i> (phytoalexin-deficient 2-1)	20%	extrêmement sensible aux interactions pathogènes	Parisy et al., 2007
<i>znr1</i> (zinc tolerance induced by iron 1)	15%	défectueux dans la tolérance au Zn, Fe-dépendante	Shanmugam et al., 2012
<i>nrc1</i> (non-response to cadmium 1)	36%	ne parvient pas à régler le métabolisme du Cd	Jobe et al., 2012

I.2.5.2. Rôles du glutathion

Nous avons vu les propriétés du glutathion comme un piègeur des ROS, ou un antioxydant mais, même si sa concentration cellulaire est élevée, sa vitesse de réaction avec les ROS est faible relativement à d'autres antioxydants comme les caroténoïdes, les tocophérols (Tableau 2), ou encore l'ascorbate (nous verrons cela dans l'Article 1 : Rahantaniaina et al., 2013, Section II.1 des résultats). La probabilité que le GSH réagisse avec les ROS avant les autres antioxydants est donc faible. La fonction principale du glutathion dans la détoxification des ROS est celle de cofacteur pour des peroxydases (Tableau 3).

Par contre, le GSH joue un rôle prépondérant dans la détoxification des métaux lourds tels que le cadmium, Cd, le mercure, Hg ou encore l'arsenic, As (Fig. 12 ; Hernández et al., 2015). Ces métaux sont très toxiques, conduisant à la surproduction de ROS. Néanmoins, les plantes ont mis en place un système de chélation et de séquestration pour éviter leur effets toxiques (Hernández et al., 2015). Le glutathion est le précurseur des phytochélatines, PC, des peptides ligands formés par polymérisation du glutathion, qui limitent la concentration des ions métalliques libres (Hernández et al., 2015). Les phytochélatines sont synthétisés grâce aux phytochélatines synthases, PCS (Cobbett et Goldsbrough, 2002) dont l'activité est stimulée en présence de stress au Cd, Hg ou As (Clemens et al., 1999 ; Ha et al., 1999). Les complexes PC-métaux formés peuvent être transportés des racines vers les parties aériennes de la plante (Mendoza-Cózatl et al., 2011), où ils sont séquestrés dans les vacuoles des cellules. Le passage dans les vacuoles se fait via des transporteurs du type ABCC (Fig. 14), tels que AtABCC1 et AtABCC2 ou encore AtABCC3 chez *Arabidopsis* (Mendoza-Cózatl et al., 2010 ; Park et al., 2012 ; Brunetti et al., 2015). Chez le double mutant, *atabcc1 atabcc2* la séquestration vacuolaire du Cd est perturbée compromettant ainsi la détoxification du Cd (Park et al., 2012). Chez le riz, l'importance de tels transporteurs dans la séquestration de l'As a également été démontrée (Song et al., 2014). Ces connaissances sur le rôle du glutathion dans la détoxification des métaux lourds permettent de prédire les plantes les plus efficaces pour la phytoremédiation des sols (Peuke et Rennenberg, 2005 ; Vangronsveld et al., 2009).

Le glutathion peut également détoxifier directement des xénobiotiques électrophiles, comme certains herbicides et pesticides par exemple. Dans cette fonction, interviennent les glutathion-S-transférases, GST, des enzymes qui peuvent conjuguer le glutathion avec ces composés toxiques (Fig. 12 ; Edwards et Dixon, 2005 ; Edwards et al., 2010 ; 2011 ; Cummins et al., 2013 ; Mannervik, 2012 ; Pang et al., 2012 ; Labrou et al., 2015). Les composés solubles non toxiques formés seront ensuite stockés et dégradés par une γ -glutamyl-transpéptidase ou par une carboxy-péptidase au niveau de la vacuole (Wolf et al., 1996 ; Leustek et al., 2000 ; Rea, 2007 ; Ohkama-Ohtsu et al., 2008). De nombreuses études biochimiques ont permis de mettre en évidence les fonctions de conjugaison des GSTs (Neuefeind et al., 1997 ; Dixon et al., 2009 ; Dixon et Edwards, 2010 ; Cummins et al., 2013). Quelques études récentes valident *in planta* l'implication des GSTs dans la détoxification de certains xénobiotiques et que leur surexpression peut l'améliorer (Dixon et al., 2003 ; Yu et Powles 2014). Toutes ces connaissances ont stimulé le développement de nouvelles applications en biotechnologie agricole basées sur les fonctions essentielles des GSTs (Chronopoulou et Labrou, 2009). Elles sont ainsi exploitées pour le développement de plantes transgéniques ayant une résistance accrue à divers stress (Benekos et al., 2010 ; Sharma et al., 2014).

I.2.5.3. Transport et dégradation du glutathion

La compartimentation et la distribution du GSH dans la cellule sont importantes pour la tolérance au stress (Fig. 14 ; Zechmann, 2014). Le glutathion est l'une des principales formes de soufre organique qui peut être transporté *via* le phloème (Herscbach et Rennenberg, 1994 ; 1995 ; Mendoza-Cózatl et al., 2008 ; Mendoza-Cózatl et al., 2011). Entre les cellules, le glutathion peut se déplacer par une voie apoplastique, et/ou symplasmique ou les deux. La famille des OPT, pour « oligopeptide transporter » pourrait être responsable du transport du glutathion à travers la membrane plasmique (Fig. 14). Parmi les neuf gènes d'*Arabidopsis* qui codent pour les OPTs (Koh et al., 2002), *OPT6* jouerait un rôle dans le transport du glutathion à longue distance (Cagnac et al., 2004). Le gène de *OPT6* est fortement exprimé dans le système vasculaire, la protéine correspondante pourrait transporter aussi bien le GSH et le GSSG que les complexes conjugués au glutathion (Cagnac et al., 2004). Une redondance fonctionnelle entre les différents OPT, a été suggérée, le mutant *Atopt6* ne montrant pas de phénotype (Pike et al., 2009).

Plusieurs types de transporteurs interviennent dans la translocation du glutathion entre les compartiments subcellulaires. Il est à noter que la deuxième étape de la synthèse du glutathion peut se dérouler dans le cytosol et dans les plastes ; l'exportation de γ -EC des plastes vers le cytosol est donc nécessaire (Fig. 14 ; Pasternak et al., 2008). La γ -EC et le GSH peuvent être transportés à travers l'enveloppe chloroplastique par une petite famille de transporteurs, appelée « chloroquinone resistance transporter-like », CLT (Fig. 14 ; Maughan et al., 2010). Chez *Arabidopsis*, trois gènes codent pour les CLT, ce sont le *CLT1*, *CLT2* et *CLT3*. Le triple mutant dépourvu des trois isoformes de CLT montre une diminution du pool de glutathion dans le cytosol et non dans les chloroplastes (Maughan et al., 2010). Le glutathion est ensuite transporté du cytosol vers les autres compartiments (mitochondries, noyau, peroxysomes) par des transporteurs membranaires (Fig. 14). Des expériences d'immunocytochimie chez *Arabidopsis* ont mis en évidence des concentrations élevées en glutathion dans les mitochondries malgré l'absence de sa synthèse dans cet organelle (Zechmann et al., 2008). La même étude a

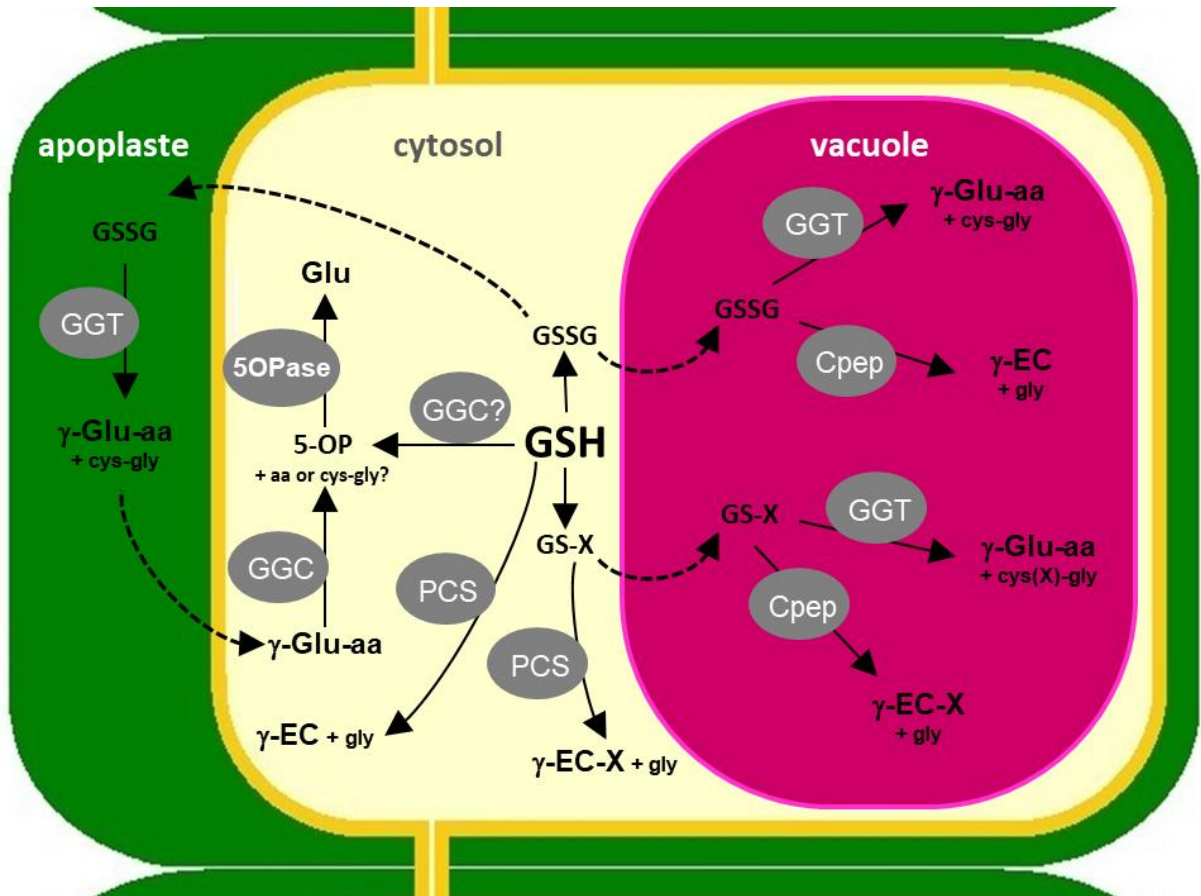


Figure 15 : Différentes voies possibles de dégradation du glutathion dans la cellule végétale

Pour simplifier, toutes les réactions en aval de la dégradation du glutathion ne sont pas montrées et les formes disulfures des produits de dégradation du GSSG sont omises. En plus de la transpeptidation, la γ -glutamyl transpeptidase, GGT pourrait également catalyser l'hydrolyse de GSH en Glu et Cys-Gly. aa, acide aminé ; Cpep, carboxypeptidase ; GGC, γ -glutamylcyclotransférase ; 5-OP, 5-oxoproline ; 5-OPase, 5-oxoprolinase ; PCS, phytochélatine synthase ; X, composé conjugué à S. Schéma modifié à partir de Noctor et al., 2012.

également détecté une proportion significative de GSH dans le noyau. Il est donc été suggéré que des transporteurs tels que les BAG, pour « Bcl2-associated anathogene » contrôleraient la concentration de GSH mitochondriale et nucléaire (Fig. 14). La concentration du glutathion dans les peroxysomes serait similaire à celle du cytosol (Zechmann et al., 2008). Vraisemblablement, dans les peroxysomes, le GSH résulte de son importation du cytosol, mais les transporteurs membranaires responsables de cette activité n'ont pas été identifiés.

En ce qui concerne les transporteurs vers la vacuole, s'il est démontré que les concentrations vacuolaires de glutathion sont faibles dans des conditions non stressantes pour la plante (Rennenberg, 1982 ; Zechmann et al., 2008 ; Queval et al., 2011) ; une forte accumulation de GSSG dans les vacuoles est une réponse typique en condition de stress (Queval et al., 2011). L'explication la plus probable de cette accumulation serait un transfert direct de GSSG du cytosol vers la vacuole (Noctor et al., 2013). Les MRPs pour « multidrug resistance-associated protein », désignés maintenant sous le nom de transporteurs du type ABCC assurent probablement cette fonction (Fig. 14 ; Martinoia et al., 1993 ; Rea, 1999 ; Foyer et al., 2001 ; Mendoza-Cózatl et al., 2010 ; Park et al., 2012 ; Brunetti et al., 2015). Structuellement, le GSSG peut être considéré comme une auto-conjugaison du glutathion. Des études *in vitro* ont montré que des isolats de vacuoles d'orge peuvent prendre en charge le GSSG. *In vivo*, la capacité de certaines protéines du tonoplaste des vacuoles d'*Arabidopsis* a été démontré à transporter aussi bien des complexes conjugués au glutathion que le GSSG, un système hétérologue (Martinoia et al., 1993 ; Tommasini et al., 1993 ; Lu et al., 1997 ; 1998). Chez *Arabidopsis*, 15 gènes codent pour les ABCC (Wanke et Kolukisaoglu, 2010).

Chez les plantes, de même que chez certains champignons, les GS-conjugués sont importés dans les vacuoles, pour y être dégradés (Fig. 15 ; Rea, 2007). Les voies de dégradation du glutathion ne sont pas encore clairement établies chez les plantes. La liaison entre le glutamate et la cystéine n'étant pas une liaison peptidique (vue dans la Section I.2.5.1), la dégradation du glutathion n'est possible par des protéases. D'après la littérature, quatre types d'enzymes seraient capables d'initier la dégradation du glutathion.

Le GSH ou les GS-conjugués pourraient être dégradés par une activité carboxypeptidase, Cpep (Fig. 15 ; Steinkamp et Rennenberg 1985). Une telle activité a bien été détectée dans des vacuoles de l'orge (Wolf et al., 1996). Une autre enzyme, proposée est impliquée dans la dégradation des GS-conjugués, il s'agit de la phytochélatine synthase cytosolique (PCS ; Fig. 15 ; Blum et al., 2007 ; 2010). La troisième enzyme est la GGT, pour γ -glutamyl transpeptidase (Fig. 15). Chez *Arabidopsis*, les GGTs sont codées par quatre gènes fonctionnels. La GGT1 est une enzyme active contre le GSH, le GSSG et les GS-conjugués, majoritaire dans tous les tissus d'*Arabidopsis*, sauf dans les graines et les siliques (Martin et Slovin, 2000 ; Storozhenko et al., 2002) où GGT2 est spécifiquement exprimée (Martin et Slovin, 2000 ; Storozhenko et al., 2002). GGT1 et GGT2 semblent être liées à la paroi cellulaire (Martin et al., 2007 ; Ohkama-Ohtsu et al., 2007a). GGT4 (correspondant à GGT3 chez *Arabidopsis*) est présente dans la vacuole et est probablement impliquée dans la dégradation des GS-conjugués (Grzam et al., 2007 ; Martin et al., 2007 ; Ohkama-Ohtsu et al., 2007b). La GGT3, bien qu'exprimée dans divers tissus contribuerait de manière mineure à l'activité des GGTs (Martin et al., 2007 ; Destro et al., 2010). Une molécule d' H_2O , ou un autre acide aminé, peut être transféré sur le peptide γ -glutamyl libéré suite à l'action de la

GGT. Les peptides γ -glutamyl produits peuvent par la suite subir l'action séquentielle d'une γ -glutamyl cyclotransférase, GGC, puis d'une 5-oxoprolinase, OXP, afin de libérer le glutamate (Fig. 15 ; Ohkama-Ohtsu et al., 2008). Chez *Arabidopsis*, aucun gène *GGC* n'a encore été identifié, et un seul gène code probablement pour une OXP cytosolique (Ohkama-Ohtsu et al., 2008). Des mutants simples invalidés pour le gène *OXPI*, et des triples mutants *oxpl ggt1 ggt4*, présentent une accumulation du 5-oxoproline. Cela suggère que la voie prédominante de la dégradation du GSH est cytosolique et qu'elle est initiée par les GGC, et non par des GGT vacuolaires ou extracellulaires (Ohkama-Ohtsu et al., 2008). La GGC serait donc un quatrième type d'enzyme susceptible d'initier la dégradation du glutathion. Cependant, des GGC de tabac se sont montrées incapables d'utiliser le GSH (Fig. 15 ; Orłowski et Meister, 1973 ; Steinkamp et al., 1987).

I.2.5.4. Importance du potentiel redox du glutathion

L'approche de génétique inverse chez *Arabidopsis* a permis de mettre en évidence une interconnexion entre les systèmes NADPH-TRX et le glutathion (Reichheld et al., 2007 ; Marty et al., 2009 ; Bashandy et al., 2010). Comme les GRXs dont la réduction dépend directement du GSH peuvent avoir des fonctions redondantes avec les TRXs (Meyer et al., 2008), il est aussi possible que, dans certaines conditions, les modifications du potentiel redox du glutathion influencent l'état redox des TRXs. Le GSH impacterait, indirectement, l'activité des protéines TRXs. Pour exemple, une augmentation du potentiel redox de -350 à -300 mV permet la conversion de la glucose-6-phosphate déshydrogénase chloroplastique de l'état peu actif à son état d'activation maximale (Née et al., 2009). Un changement d'environ 50 mV du potentiel redox du glutathion est biologiquement possible et une telle modification peut ainsi perturber l'équilibre entre les formes réduites et oxydées de certaines protéines régulées par les TRXs (Setterdahl et al., 2003).

Le potentiel redox du glutathion est lié au rapport $[GSH]^2/[GSSG]$. Ainsi, il est influencé par sa concentration absolue ainsi que par son état redox (Mullineaux et Rausch, 2005 ; Meyer, 2008). Même si le ratio GSH/GSSG reste inchangé, la diminution de la concentration en glutathion seule peut conduire à une augmentation du potentiel redox. Chez le triple mutant *clt1 clt2 clt3*, dépourvu des transporteurs de glutathion au niveau de l'enveloppe chloroplastique (Fig. 14), la diminution du pool de glutathion dans le cytosol, et non dans le chloroplaste, conduit à l'augmentation du potentiel redox cytosolique et non plastidial (Maughan et al., 2010).

Le couple redox glutathion est considéré comme un acteur clé dans l'ajustement homéostatique du potentiel redox cellulaire et, probablement, dans la transduction du signal ROS. Il agit via des processus tels que la formation de ponts disulfures mixtes avec les protéines (Dixon et al., 2005 ; Feechan et al., 2005 ; Tada et al., 2008 ; Palmieri et al., 2010 ; Zaffagnini et al., 2012a). En effet, le glutathion peut former un pont disulfure entre le thiol de sa cystéine et un thiol protéique accessible, c'est la réaction de S-glutathionylation (Dixon et al., 2005 ; Hurd et al., 2005a, b ; Zaffagnini et al., 2012a, 2012b). Il s'agit d'une modification post-traductionnelle réversible, permettant de protéger de l'oxydation les cystéines des protéines cibles, pouvant également moduler, positivement ou négativement, l'activité de ces dernières. Un grand nombre de protéines, de toutes catégories fonctionnelles, peuvent subir une glutathionylation, elles ont été répertoriées par Ghezzi (2005). La S-nitrosylation des protéines peut également réguler leur fonction, leur stabilité ou leur interaction avec d'autres

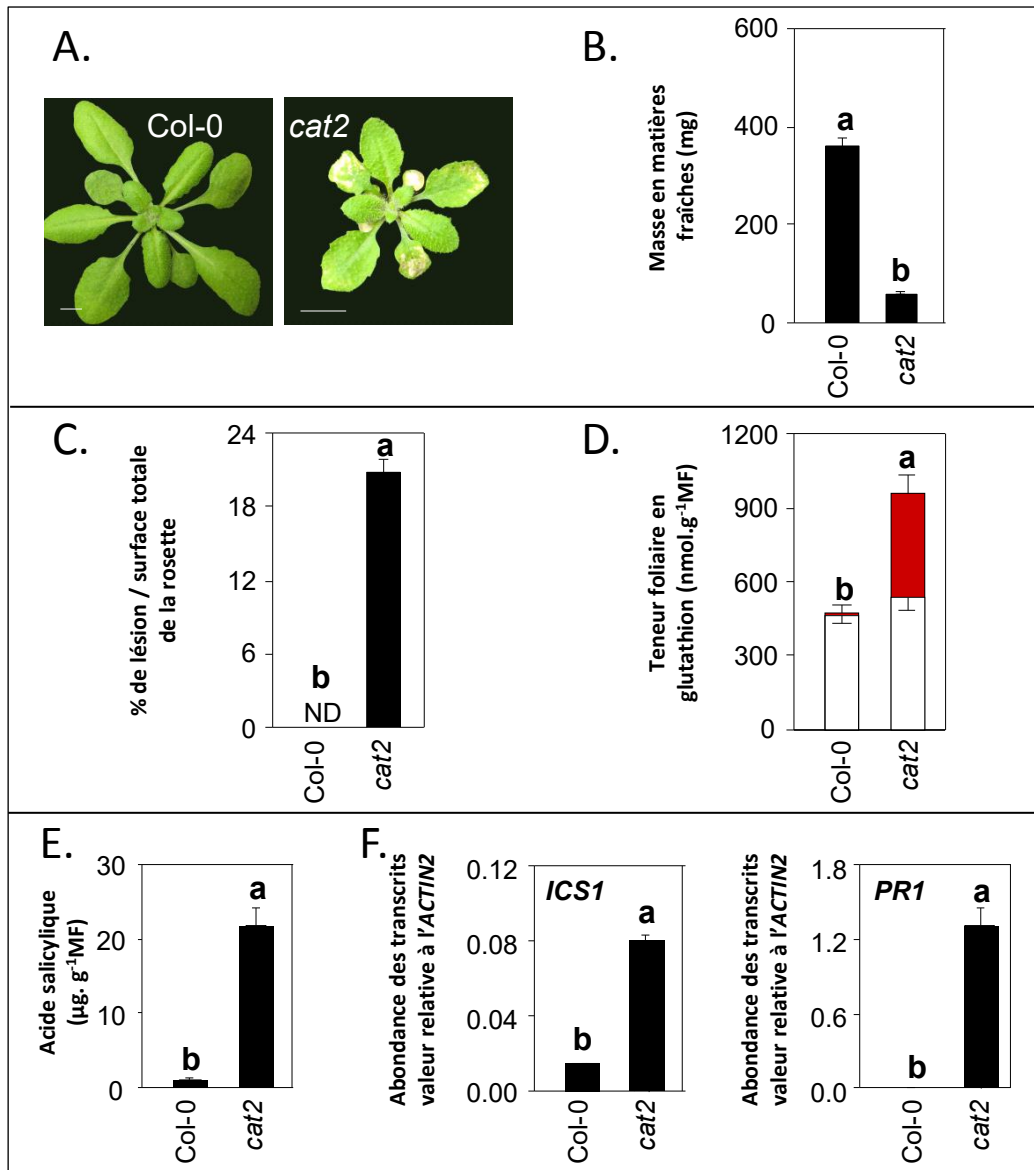


Figure 16 : Mutant *cat2* comme outil de compréhension du stress biotique, où l'accumulation et l'oxydation du glutathion s'accompagne de l'accumulation de l'acide salicylique et l'induction des gènes de défense

A. Phénotype foliaire de *cat2* comparé au sauvage, *Col-0* dont l'échelle de 1cm est indiquée par la barre blanche. B, C et D représentent respectivement la masse en matières fraîches, le pourcentage de lésions par rapport à la surface totale de la rosette et la teneur en glutathion (les barres blanches : GSH et barres rouges : GSSG). E et F montrent l'accumulation de l'acide salicylique (SA) et les expressions des gènes associés. Adaptée de l'article de Han et al., (2013a) les lettres au-dessus de chaque barre indiquent une différence significative avec $P < 0,05$.

protéines. En présence de RNS, le NO réagit facilement avec le GSH pour former du S-nitrosoglutathion, GSNO. Le GSNO est l'un des principaux nitrosothiols, régulateur majeur de l'état redox cellulaire, de faible poids moléculaire, et peut servir de réservoir endogène de NO dans les cellules végétales (Wang et al., 2006). Le rôle du GSNO dans le transfert du NO sur des protéines à thiols a des répercussions sur de nombreux processus de régulation dans les plantes face aux contraintes environnementales (Feechan et al., 2005 ; Lee et al., 2008 ; Chen et al., 2009).

Les changements dans le statut du glutathion peuvent donc avoir des conséquences importantes pour la cellule. Ces changements peuvent être spécifiques à certains compartiments subcellulaires et non à d'autres. En effet, Bratt et al. (2016) ont utilisé la roGFP (une protéine GFP sensible à l'état redox du glutathion) pour analyser, en temps réel, l'état redox des différents compartiments subcellulaires en conditions de stress. En ciblant la roGFP aux chloroplastes, aux mitochondries, aux peroxysomes et au cytosol, ces auteurs ont montré qu'en fonction des conditions de stress, le potentiel redox des organites était différenciellement affecté. L'application d'un éliciteur tel que la flagéline 22 qui induit une production de ROS via l'activation des NADPH oxydases pariétales (Felix et al., 1999 ; Kadota et al., 2014), augmente l'oxydation de la roGFP dans les peroxysomes, provoquant probablement la β -oxydation, une des sources majeures de ROS dans ces organites (vue la Section I.2.1.1.4 ; Fig. 7). Sous une forte lumière ou en stress hydrique, ce sont les statuts redox des chloroplastes et des mitochondries qui sont respectivement altérés (Bratt et al., 2016). Ces résultats confirment que le potentiel redox du glutathion peut jouer un rôle majeur et différentiel dans la perception du stress oxydant à l'échelle subcellulaire.

I.2.5.5. Le glutathion, molécule signalale dans la signalisation redox

De nombreuses études démontrent que le GSH est important dans la transmission du signal redox (Fig. 12). En plus de servir de source de soufre pour la biosynthèse de métabolites secondaires importants lors d'une attaque par des pathogènes ou des insectes, le glutathion est également impliqué dans les processus de signalisation pendant un stress biotique. Les études sur des mutants d'*Arabidopsis* altérés le métabolisme du GSH l'ont démontré. En effet, la résistance aux pathogènes fongiques et bactériens est compromise chez les mutants d'*Arabidopsis pad2*, *cad2* et *rax1* qui sont déficients en glutathion (Glazebrook et Ausubel, 1994 ; May et al., 1996 ; Ball et al., 2004), tandis que la surexpression de γ -ECS dans le tabac renforce sa résistance à *Pseudomonas* (Ghanta et al., 2011).

En outre, il a été proposé que l'état redox du glutathion soit un déterminant clé de la MCP (Kranter et al., 2006). Selon ce concept, une augmentation de l'accumulation de GSSG, ou une augmentation du potentiel redox au-dessus d'une valeur seuil, entraînerait une mort cellulaire certaine. Par exemple, la surexpression ectopique de γ -ECS dans le chloroplaste du tabac produit des augmentations de la teneur en glutathion totale mais aussi une accumulation de GSSG, associée à la formation de lésions et à l'expression accrue des gènes *PR* (Creissen et al., 1999). En outre, chez le mutant *cat2*, l'oxydation et l'accumulation du glutathion sont associées à la formation de lésions foliaires de type HR (Fig. 16 ; Edwards et al., 1991 ; May et al., 1996), à l'accumulation de SA et à l'induction de l'expression de gènes de défense tels que le *PR1*, comme lors d'une infection par des agents pathogènes (Fig. 16 ; Chaouch et al., 2010).

Cependant, d'après les connaissances actuelles, les changements dans le potentiel redox du glutathion ou l'accumulation de GSSG sont nécessaires mais pas suffisants pour provoquer la MCP. En effet, premièrement, chez *cat2*, les lésions de type HR peuvent être abolies en bloquant génétiquement la synthèse du SA, même s'il y a accumulation de GSSG (Chaouch et al., 2010). Deuxièmement, la forte accumulation de GSSG chez *cat2 gr1* ne provoque pas de lésions de type HR, mais réprime la synthèse du SA (Mhamdi et al., 2010b). Et troisièmement, dans le double mutant *cat2 atrbohF* le glutathion est beaucoup moins perturbé que chez *cat2*, et pourtant les lésions foliaires ne sont pas amoindries pour autant (elles sont même accentuées ; Chaouch et al., 2012).

Une étude provenant de notre équipe a mis en évidence qu'outre ses fonctions antioxydantes, le glutathion est une molécule signalant à part entière faisant le lien entre H_2O_2 et l'activation des réponses SA-dépendantes (Han et al., 2013a). La comparaison des phénotypes contrastés de *cat2 cad2* et *cat2 gr1* a montré que des processus glutathion-dépendants relient le H_2O_2 et l'activation des réponses de pathogenèse SA-dépendantes par un effet qui est additionnel aux fonctions antioxydantes du glutathion. En outre, la comparaison de *cat2 cad2* avec *cat2 npr1*, a révélé peu de chevauchement entre les réponses des deux doubles mutants. La NPR1 est présente dans le cytosol sous forme d'homo-oligomères inactifs au sein desquels les monomères sont associés par des ponts disulfures. Lors de la stimulation des réponses de défense, l'oligomère est dissocié en monomères par réduction des ponts disulfures grâce à une thiorédoxine (Tada et al., 2008). Les monomères sont ensuite transloqués dans le noyau où ils interagissent et activent le facteur de transcription TGA1 régulant positivement l'expression de différents gènes de défense, dont *PR1* (Lindermayr et al., 2010). Le peu de chevauchement dans les réponses entre *cat2 cad2* et *cat2 npr1* indique que l'oxydation et l'accumulation du glutathion dans le mutant *cat2* jouent un rôle dans le couplage entre H_2O_2 et l'accumulation de SA déclenchée par ICS1 (« Isochorismate synthase 1 » impliqué dans la synthèse de SA) en amont de NPR1.

I. Introduction générale

I.3. Objectifs de l'étude et présentation des résultats

Les objectifs de mon travail de thèse sont organisés en deux axes. Le premier vise à évaluer les voies métaboliques les plus importantes dans le contrôle du stress oxydant chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Le deuxième est un travail de modélisation visant à construire et à configurer un modèle capable de simuler le comportement du métabolisme du H₂O₂, dans le but d'élaborer un outil d'aide à l'interprétation de données expérimentales.

I.3.1. Analyses des voies antioxydantes glutathion-dépendantes

I.3.1.1. Recherches bibliographiques

Il est désormais largement admis que les ROS représentent des molécules signales jouant un rôle important dans la transmission des informations au cours des réponses des cellules végétales face aux contraintes environnementales (vue dans la Section I.2.2). D'un point de vue général, tous les signaux conduisent à des ajustements en aval dans l'état redox intracellulaire (Edwards et al., 1991 ; Vanacker et al., 2000 ; Volt et al., 2009). Ces ajustements concernent, notamment, l'activation de protéines cytosoliques thiol-dépendantes. L'un des acteurs clés régissant l'état redox intracellulaire est un composé thiol/disulfure, le glutathion (nous l'avons vu dans la Section 1.2.5). Bien que cette petite molécule joue des rôles très importants dans la défense et le métabolisme, sa fonction clé dans la cellule est le maintien de l'homéostasie redox (Foyer et Noctor, 2011).

Une oxydation accrue du glutathion, accompagnée d'une augmentation du pool total, est une réponse bien documentée dans les plantes soumises à des traitements tels que l'ozone, le froid, les agents pathogènes ou encore chez le mutant *cat2* (Edwards et al., 1991 ; Sen Gupta et al., 1991 ; May et al., 1996 ; Vanacker et al., 2000 ; Bick et al., 2001 ; Gomez et al., 2004 ; Queval et al., 2007 ; Koornneef et al., 2008). Cependant, s'il est bien établi que la réduction du GSSG en GSH est assurée par la GR1 chez *Arabidopsis* (vue dans la Section I.2.4.2.2), les réactions qui sont les plus importantes dans la conversion de GSH en GSSG sont moins claires et, potentiellement, plus complexes. Dans un premier temps, j'ai recensé les différentes voies liées au métabolisme des ROS, susceptibles d'oxyder le GSH en GSSG. Mes analyses ont fait l'objet d'une revue scientifique (**Article 1**).

I.3.1.2. Etudes de mutants d'*Arabidopsis*

De nombreuses études en laboratoire de biologie végétale utilisent *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) comme plante modèle pour, notamment, sa petite taille et son cycle de développement court (deux mois) produisant un grand nombre de graines (quelques dizaines de milliers). *Arabidopsis* peut, donc, être cultivée rapidement, à haut rendement et sur une petite surface. De plus, son génome (ensemble de son matériel génétique), a été entièrement séquencé (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), permettant ainsi d'estimer le nombre total de ses gènes à 33 602 (<http://www.arabidopsis.org>), avec 27 416 gènes codant pour des protéines, 4 827 pseudogènes (gènes inactifs) ou des gènes transposables (capables de se déplacer) et 1 359 ARNnc (gènes transcrits en ARNs mais non traduits en protéines). Toutes ces informations ont permis de faire d'*Arabidopsis* un modèle d'étude pour la génétique inverse, l'approche favorisée pendant ma thèse. La génétique inverse est une approche de

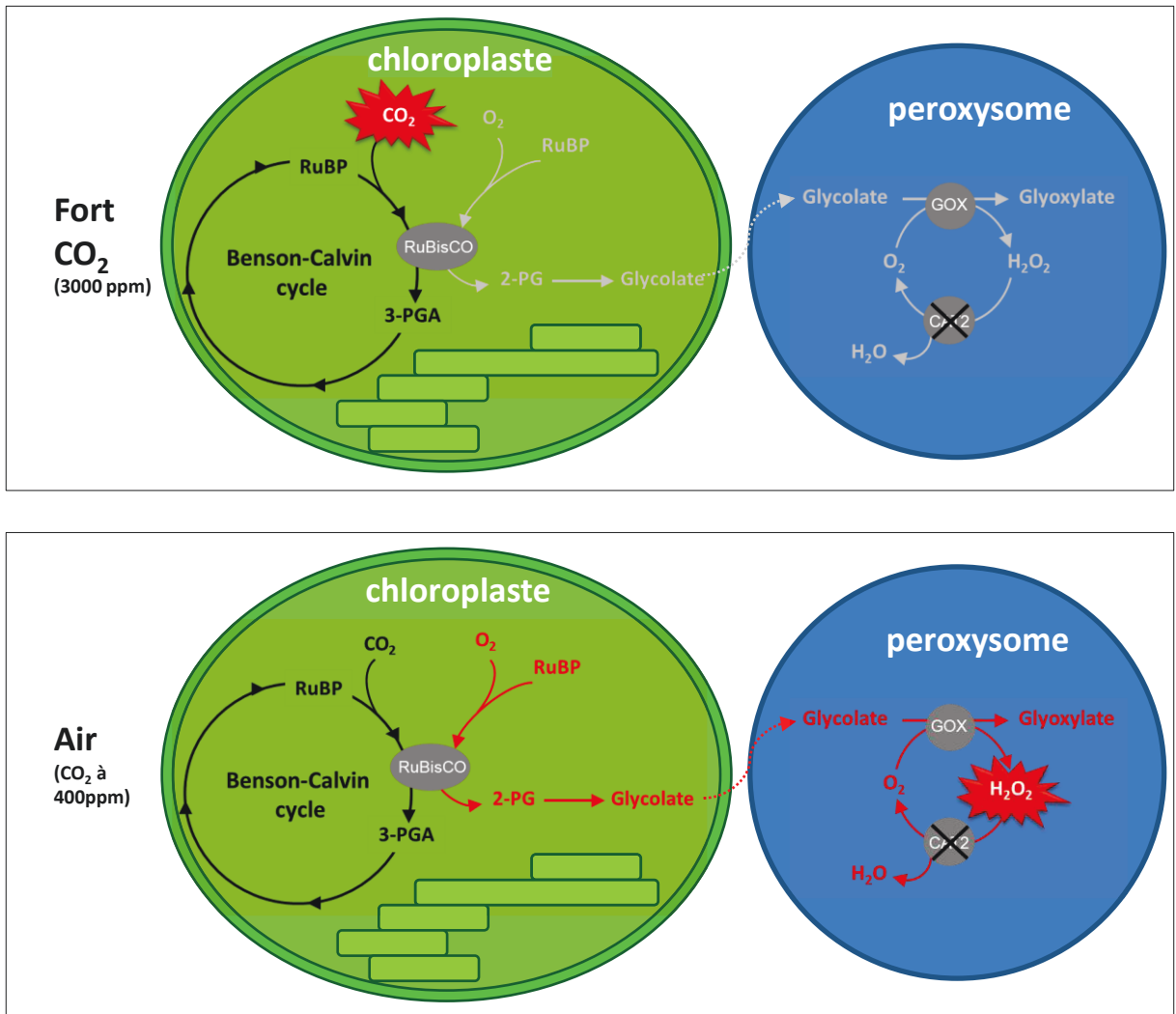


Figure 17 : Représentation schématique du déclenchement de la production de H₂O₂ chez le mutant photorespiratoire *cat2*

Dans la plupart des organismes, les CAT se trouvent principalement dans les peroxysomes (Zamocky et al., 2008). Le mutant déficient en catalase *cat2* d'*Arabidopsis* (CAT2 étant l'isoforme majoritaire de la feuille) est un mutant conditionnel qui subit un stress oxydant dans l'air en conditions de lumière modérée à élevée lorsque la photorespiration est active. A faible luminosité, ou à forte teneur en CO₂, lorsque la photorespiration est lente ou négligeable le mutant *cat2* n'est pas en situation de stress oxydant (stoechiométries non respectées).

génétique cherchant à comprendre la fonction de gènes donnés par l'observation des mutants correspondants. Cette approche « s'oppose » à la démarche de génétique classique, qui, pour un phénotype mutant donné, cherche à identifier le(s) gène(s) responsable(s). Grâce à la génétique inverse, l'expression d'un gène ciblé peut être éteinte, diminuée ou augmentée, et les analyses des conséquences qui en découlent peuvent permettre de déterminer sa (ses) fonction(s).

Dans un second temps, j'ai donc entrepris une approche de génétique inverse chez *Arabidopsis* afin de réaliser une analyse fonctionnelle *in planta* des gènes candidats identifiés dans la Section II.1 (Partie II. Résultats). Un système important pour ces études a été le mutant photorespiratoire *cat2*. Ce mutant, déjà bien caractérisé, a été obtenu par disruption du gène qui code pour la CATALASE2 (CAT2 ; Queval et al., 2007 ; 2009 ; Mhamdi 2010a ; 2010 b ; 2010c ; Chaouch 2010, Han et al., 2013a ; 2013b ; Li et al., 2013). Les catalases, présentes dans les peroxysomes, sont d'importantes enzymes dans le métabolisme de H_2O_2 (voir Section I.2.4) qui, dans la cellule végétale, est majoritairement produit lors de la photorespiration (vue dans la Section I.2.1.1.4). En l'absence de CAT2, la plante subit un stress oxydant en conditions photorespiratoires (Fig. 17). En effet, dans l'air et sous une lumière modérée ou forte, des lésions foliaires, assimilées à celles mises en place lors d'une exposition à l'ozone ou encore lors d'une attaque pathogène apparaissent (Fig. 8). Par contre, en conditions non photorespiratoires, quand la luminosité est faible ou la concentration en CO_2 est élevée, le mutant *cat2* se comporte comme le génotype sauvage. Par conséquent, le mutant *cat2* est un mutant conditionnel. Malgré l'apparition des lésions nécrotiques à la surface des feuilles chez le mutant *cat2*, ses teneurs en H_2O_2 sont relativement stables, par contre, le statut de glutathion est très clairement perturbé lorsque *cat2* est en conditions photorespiratoires (Fig. 17). Dans ces conditions, le glutathion s'accumule, essentiellement sous la forme de GSSG et cette réponse est accompagnée par une activation des voies liées à la pathogénèse (Fig. 16).

Nous avons donc utilisé le système modèle *cat2* comme outil pour explorer expérimentalement l'importance relative des enzymes candidates dans l'oxydation de glutathion en conditions de stress oxydant. Ceci a impliqué la production de doubles, triples, voire quadruples mutants. Certaines de ces lignées étaient déjà disponibles lors de mon arrivée au laboratoire (thèse de Shengchun Li, 2013). Cependant, elles avaient été peu caractérisées en ce qui concerne les réponses des pools d'ascorbate et de glutathion ainsi que les répercussions sur les voies de signalisation liées aux attaques pathogènes. Les caractérisations phénotypique, biochimique et métabolique de ces mutants ont fait l'objet de deux articles de recherche (**Article 2** dans la Section II.2 et **Article 3** dans la Section II.3).

I.3.2. Modélisation des interactions entre la catalase et la voie ascorbate-glutathion dans le métabolisme du H_2O_2

Modéliser le vivant, c'est poser des équations pour le représenter dans un cadre idéalisé, en utilisant des hypothèses et des règles préalablement définies et qui vont servir à construire le modèle. En raison de la grande complexité du mécanisme du stress oxydant chez la plante face aux contraintes environnementales, la modélisation se présente comme étant un outil puissant de compréhension théorique, capable de traiter de nombreuses informations en même temps. En effet, modéliser consiste à poser des équations, tenant compte de

nombreux processus biologiques et chimiques. Ces équations différentielles ordinaires permettent de simuler le comportement dynamique des systèmes.

Un modèle mécaniste est basé sur des processus, il nécessite des connaissances fiables sur les processus cellulaires (par exemple, propriétés des enzymes, concentrations des substrats). A ce jour, très peu de modèles mécanistes ont été élaborés sur les rapports entre les ROS et les systèmes antioxydants chez les plantes. Le premier modèle est paru en 2001 (Polle, 2001). Il a été construit pour simuler le stress oxydant dans les chloroplastes. L'intérêt de ce genre d'approche est de contribuer à la compréhension théorique des processus sous-jacents au stress oxydant, de calculer les variations des concentrations et des flux des différents acteurs, ce qui permettrait de faire émerger des questions et des hypothèses nécessitant une validation expérimentale (Polle, 2001). Le modèle de Polle a été par la suite repris et amélioré (Valero et al., 2009 ; 2016). Cependant, cette équipe s'est également limitée à l'échelle des chloroplastes.

En construisant un nouveau modèle, notre objectif a été, avant tout, de reproduire le plus fidèlement possible ce qui a été observé lors des études sur les plantes. Au cours de cette analyse, j'ai rassemblé tous les paramètres nécessaires à la construction du modèle, non seulement ceux qui proviennent de la littérature, mais également ceux que j'ai apportés via mes résultats expérimentaux au laboratoire. A l'aide de ces informations, nous avons pu élaborer un modèle capable de simuler le métabolisme du H_2O_2 en lien avec les catalases et/ou la voie ascorbate-glutathion, aussi bien en conditions optimales de croissances qu'en situation de stress, pendant plusieurs jours consécutifs (**Article 4** dans la Section II.4).

I.3.3. Format de la présentation des résultats

Les principaux résultats de ma thèse sont présentés sous forme de quatre articles. Chaque article est précédé d'un préambule visant à situer d'abord l'étude, et il est suivi d'une discussion des principaux résultats obtenus. Des transitions expliquent la cohérence globale de ma démarche. Une discussion plus développée et une conclusion générale suivies des perspectives de mes travaux de thèse terminent ce manuscrit avec les Parties III et IV.

Partie II. Résultats

II. Résultats

II.1. Etude approfondie des voies antioxydantes glutathion-dépendantes

II.1.1 Préambule 1

Comme vu précédemment dans la partie introductive de ce manuscrit, le glutathion est une molécule multifonctionnelle (Noctor, 2006 ; Foyer et Noctor, 2009 ; 2011 ; Mhamdi et al., 2010 ; Noctor et al., 2012 ; Han et al., 2013a ; 2013b ; Kocsy et al., 2013 ; Schmitt et al., 2014). Malgré les nombreuses connaissances cumulées sur cette petite molécule redox très réactive, l'identification des voies antioxydantes glutathion-dépendantes reste à élucider chez les végétaux.

Ces voies peuvent être, soit métaboliques, soit enzymatiques ; ce travail de thèse s'est focalisé sur les réactions enzymatiques concernées. Etudier les voies antioxydantes glutathion-dépendantes revient à identifier les enzymes clés de l'oxydation du glutathion. En effet, si plusieurs études rapportent que le glutathion s'oxyde et s'accumule en situation de stress (Edwards et al., 1991 ; Sen Gupta et al., 1991 ; May et al., 1996 ; Vanacker et al., 2000 ; Bick et al., 2001 ; Gomez et al., 2004 ; Queval et al., 2007 ; Koornneef et al., 2008), les enzymes utilisatrices du GSH conduisant à son oxydation restent à déterminer.

L'enjeu majeur de cette étude était de déterminer quelles enzymes semblent être les plus impactantes sur son état redox ? J'ai ainsi commencé par identifier les différentes voies possibles, puis je les ai hiérarchisées en fonction de leur efficacité à oxyder le GSH en tenant compte de trois critères : les données biochimiques, les données d'expression de gènes codant pour les enzymes impliquées et les données génétiques sur ces voies.

Compte tenu de l'importance qu'il faut accorder aux sites de production des ROS (vue dans la **Partie I, Section I.2.1.1**), qui constituent un des éléments clés de la transmission de la signalisation oxydative (voir dans la **Partie I, Section I.2.3**) la localisation subcellulaire de chacune de ces voies a été précisée dans le travail qui suit.

ARTICLE 1

Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants?

Rahantaniaina MS, Tuzet A, Mhamdi A, Noctor G

Frontiers in Plant Science (2013) 4, 477.



Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants?

Marie-Sylviane Rahantaniaina^{1,2}, Andrée Tuzet², Amna Mhamdi¹ and Graham Noctor^{1*}

¹ Institut de Biologie des Plantes, Université Paris-Sud, Orsay, France

² Institut National de Recherche Agronomique, UMR Environnement et Grandes Cultures, Thiverval-Grignon, France

Edited by:

Jean-Philippe Reichheld, CNRS, France

Reviewed by:

Christine H. Foyer, University of Leeds, UK

Stéphane D. Lemaire, CNRS - Univ Pierre et Marie Curie, France

*Correspondence:

Graham Noctor, Institut de Biologie des Plantes, Université de Paris sud, Bâtiment 630, 91405 Orsay, France
e-mail: graham.noctor@u-psud.fr

Glutathione is a small redox-active molecule existing in two main stable forms: the thiol (GSH) and the disulphide (GSSG). In plants growing in optimal conditions, the GSH:GSSG ratio is high in most cell compartments. Challenging environmental conditions are known to alter this ratio, notably by inducing the accumulation of GSSG, an effect that may be influential in the perception or transduction of stress signals. Despite the potential importance of glutathione status in redox signaling, the reactions responsible for the oxidation of GSH to GSSG have not been clearly identified. Most attention has focused on the ascorbate-glutathione pathway, but several other candidate pathways may couple the availability of oxidants such as H₂O₂ to changes in glutathione and thus impact on signaling pathways through regulation of protein thiol-disulfide status. We provide an overview of the main candidate pathways and discuss the available biochemical, transcriptomic, and genetic evidence relating to each. Our analysis emphasizes how much is still to be elucidated on this question, which is likely important for a full understanding of how stress-related redox regulation might impinge on phytohormone-related and other signaling pathways in plants.

Keywords: oxidative stress, hydrogen peroxide, dehydroascorbate, glutathione S-transferase, glutaredoxin

INTRODUCTION

Arabidopsis cannot develop past the embryonic stage without glutathione (Cairns et al., 2006), a multifunctional tripeptide thiol found in the cells of most organisms. Although this small molecule has diverse roles in defense and metabolism, a key function is in redox homeostasis (Foyer and Noctor, 2011). This protective role notably involves acting in the metabolism of oxidants such as reactive oxygen species (ROS) and buffering protein thiol groups against excessive oxidation. Like most other biological roles of glutathione, these functions depend on the redox-active cysteine residue.

While the cysteine sulphur can exist in several redox states, the key stable forms are the thiol found in reduced glutathione (GSH) and the disulphide found in GSSG. Other factors remaining constant, the concentrations of the two forms modulate the effective redox potential of the couple according to the relationship $[GSH]^2/[GSSG]$ (Meyer, 2008). When plants are growing in unchallenging conditions, in which GSH-oxidizing compounds are kept relatively low by cellular antioxidant systems, the glutathione redox potential in subcellular

compartments such as the cytosol, chloroplast, and mitochondria is maintained at highly reducing values. Redox-sensitive green fluorescent proteins (roGFP) have been developed as *in vivo* probes for cell thiol-disulfide status. Although it cannot be completely excluded that other thiols may influence their status *in vivo*, the *in vitro* specificity of roGFP oxidoreduction suggests that they report mainly on the glutathione redox potential (Meyer et al., 2007). Analyses using these probes have measured redox potentials in the cytosol, chloroplasts and mitochondria that are close to -320 mV, the midpoint potential of NADPH (Meyer et al., 2007; Schwarzländer et al., 2008; Jubany-Mari et al., 2010). If these values faithfully reflect the glutathione redox potential, they imply that the GSH:GSSG ratio is well over 1000. Thus, while total glutathione concentrations are typically in the 1–10 mM range (Queval et al., 2011), GSSG concentrations in unchallenging conditions may be 10^3 – 10^6 times lower in compartments that contain significant activities of GR.

When plants are subject to suboptimal conditions, GSSG can accumulate to higher levels. This phenomenon is observed in extracts of plants exposed to various abiotic and biotic stresses (Edwards et al., 1991; Sen Gupta et al., 1991; Vanacker et al., 2000; Bick et al., 2001; Gomez et al., 2004). Based on studies of plants deficient in enzymes such as ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT), accumulation of GSSG is quite closely related to the intracellular availability of H₂O₂ (Rizhsky et al., 2002; Mhamdi et al., 2010a), which is expected to be enhanced in stress conditions.

^aGSH and GSSG are used here to refer specifically to the thiol and disulphide forms of glutathione. Where both forms may be referred to, “glutathione” is used.

^bGPX is used to refer to a specific family of genes encoding enzymes that may catalyze only low rates of this activity *in vivo*. To avoid confusion, the biochemical activity of glutathione peroxidation (e.g., catalysed by some glutathione S-transferases) is denoted by the abbreviation “GSH peroxidase.”

The principal reactions and proteins responsible for reducing GSSG to GSH in plants are relatively well characterized. In *Arabidopsis*, two genes each encode dual-targeted glutathione reductases (GR), and this is sufficient to explain the presence of GR activity in the chloroplasts, mitochondria, cytosol, and peroxisomes (Chew et al., 2003; Kataya and Reumann, 2010). Given that GR has a K_M value for NADPH below $10\ \mu\text{M}$ (Edwards et al., 1990), conversion of GSSG to GSH is unlikely to be limited by reductant. Moreover, loss of function of *GRI*, encoding the cytosol/peroxisome enzymes, causes only moderate GSSG accumulation in leaf tissue, an observation explained by the existence of an auxiliary GSSG-reducing activity ensured by cytosolic NADPH-thioredoxin (TRX) systems (Marty et al., 2009). However, GR1 becomes more important in oxidative stress conditions (Mhamdi et al., 2010b; Dghim et al., 2013).

In contrast to GSSG reduction, the reactions that are most important in converting GSH to GSSG are less clear and, potentially, more complex. Since GSSG accumulation is not only a useful biochemical marker for oxidative stress in plants, but may also be of functional importance in transmitting signals triggered by increased H_2O_2 (Han et al., 2013a,b), the aim of the discussion below is to present an overview of current knowledge on the reactions that could be responsible for this phenomenon.

CANDIDATE PATHWAYS

ENZYME-INDEPENDENT OXIDATION

Because GSH oxidation is strongly dependent on deprotonation to the thiolate form (GS^-), electron transfer is pH-dependent. The pK_a of the GSH thiol is about 9.0. Thus, only about 1% of GSH thiols will be deprotonated at any one moment in the cytosol (pH 7.2). This percentage will be even less in more acidic compartments such as the vacuole or apoplast, although GSH concentrations are relatively low at these locations. In the chloroplast, the chemical reactivity of GSH will be favored in the light compared to the dark because photosynthetic electron transport drives alkalinisation of the stroma. Chemical oxidation of GSH can therefore be influenced by physiologically relevant changes in pH. Decreases in proton concentration will also decrease the glutathione redox potential for a given value of $[\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}]$.

The nucleophilic properties of GS^- mean that it can react with a wide spectrum of electrophiles. In some cases, this will not lead to oxidation to GSSG or other disulfide but rather formation of a stable S-conjugate with various compounds (Dixon and Edwards, 2010). Such GS-conjugates are generally transported by ATP-dependent pumps (ABCC proteins) to the vacuole, where the constituent amino acids of the glutathione moiety are recycled (Martinoia et al., 1993; Lu et al., 1998; Grzam et al., 2006). Among the molecules able to oxidize GSH to produce GSSG are ROS and dehydroascorbate (DHA), the stable non-radical product of ascorbate oxidation. Rate constants for reactions with some of these compounds are shown in **Table 1**. Glutathione reacts with singlet oxygen and superoxide at rates similar to other molecules with recognized antioxidant properties, such as ascorbate and phenolic compounds. However, both glutathione and ascorbate react appreciably slower with singlet oxygen than tocopherols and, especially, carotenoids (**Table 1**). While the reaction between GSH and the hydroxyl radical is very fast, this powerful

Table 1 | Rates of nonenzymatic reactions between glutathione and various oxidants.

Oxidant	Metabolite	k ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Singlet oxygen	Glutathione ^a	2×10^6
	Ascorbate ^a	1×10^7
	β -Carotene ^b	1.4×10^{10}
	α -Tocopherol ^b	3×10^8
Superoxide	Glutathione ^a	7×10^5
	Ascorbate ^a	2×10^5
	Kaempferol ^c	5.5×10^5
	Quercetin ^c	0.9×10^5
Hydroxyl radical	Glutathione ^f	8.1×10^9
	Ascorbate ^f	1.5×10^9
	Kaempferol ^c	4.6×10^9
	Quercetin ^c	4.3×10^9
	Glucose ^f	4.0×10^9
	Sucrose ^f	8.9×10^9
	Galactinol ^f	7.8×10^9
Hydrogen peroxide	Glutathione ^d	0.9
	Ascorbate ^e	2
	Cysteine ^d	2.9
	Thioredoxin ^d	1.1
Dehydroascorbate	Glutathione ^g	1×10^5

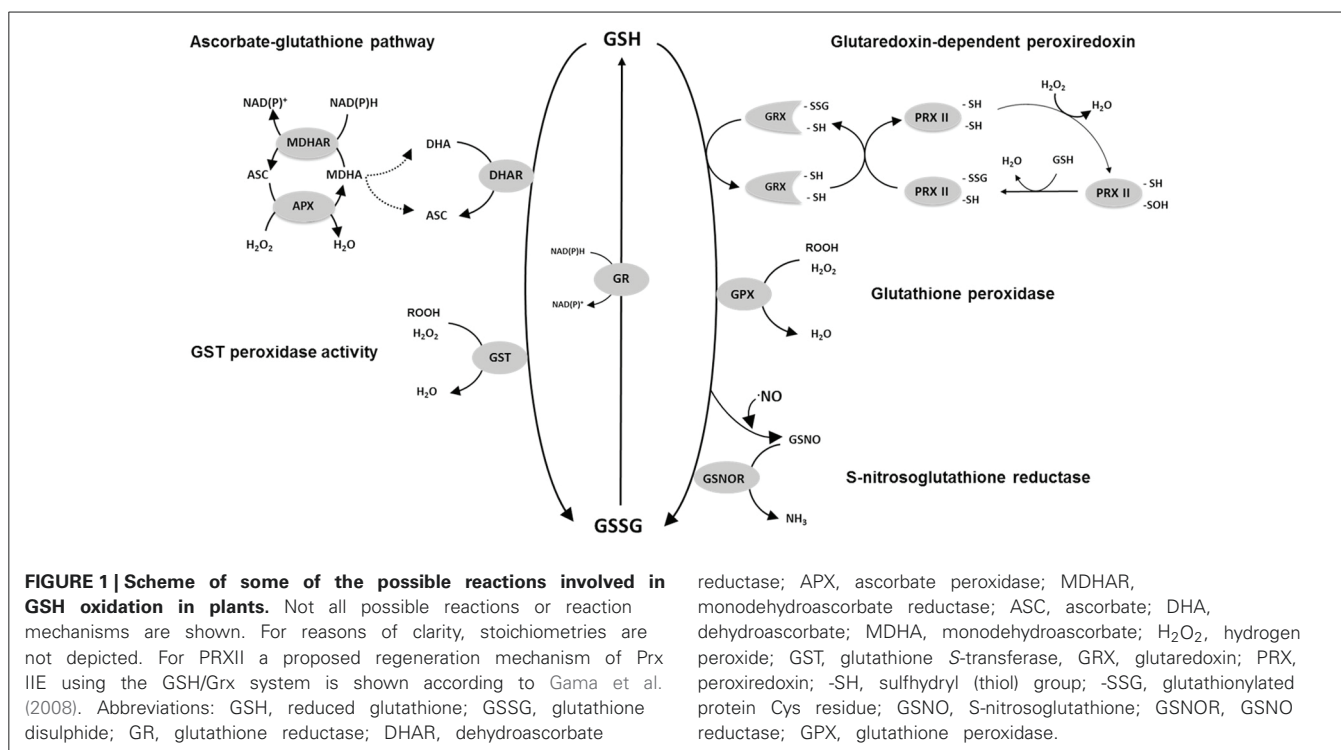
For comparative purposes, rate constants are also shown for ascorbate and other metabolites.

References: ^aAsada and Takahashi, 1987; ^bDi Mascio et al., 1989; ^cBors et al., 1990; ^dWinterbourn, 2013; ^ePolle, 2001; ^fNishizawa et al., 2008; ^gHausladen and Kunert, 1990. Values for thioredoxin are for the *E.coli* protein.

oxidant also reacts rapidly with numerous other metabolites that are present in the cellular environment at higher concentrations than GSH, such as ascorbate and sugars (**Table 1**). Thus, other compounds might be expected to compete effectively with GSH in the scavenging of both singlet oxygen and the hydroxyl radical. As for other non-enzymatic thiols, and ascorbate, the chemical reaction with H_2O_2 is very slow. Superoxide and DHA are therefore the most likely of the molecules shown in **Table 1** to contribute to uncatalyzed production of GSSG *in vivo*. This conclusion receives some support from kinetic modeling studies (Polle, 2001).

THE ASCORBATE-GLUTATHIONE PATHWAY

The slow chemical reaction of GSH with H_2O_2 contrasts with the rapid reaction with DHA (**Table 1**). This is the key observation underlying the importance ascribed to the close redox coupling of ascorbate and glutathione pools *in vivo*, which allows glutathione to play an indirect role in H_2O_2 reduction as part of a reaction sequence that ultimately depends on electrons derived from NAD(P)H and/or ferredoxin (**Figure 1**). Thus, APX reduces H_2O_2 to water, yielding monodehydroascorbate (MDHA) as an unstable initial product. MDHA that is not rapidly reduced can dismutate to ascorbate and DHA, which can then be reduced by GSH with the concomitant production of GSSG (**Figure 1**).



While GSH can chemically reduce DHA at high rates, the reaction is accelerated significantly by DHA reductases (DHAR; Foyer and Halliwell, 1977). These enzymes have been purified from several species (Hossain and Asada, 1984; Dipierro and Borranccino, 1991; Urano et al., 2000). In Arabidopsis, at least three *DHAR* genes are expressed. Although they are not able to catalyze glutathione S-conjugation reactions at significant rates, they are considered to belong to the glutathione S-transferase (GST) superfamily (Dixon and Edwards, 2010). The difference in the activities of DHARs and most classes of GST is explained by the presence of a cysteine in place of serine at the active sites of DHARs (Dixon et al., 2002).

GLUTATHIONE PEROXIDASE (GPX)

Although GSSG could be generated as a product of GSH-dependent DHA reduction, genomics has revealed the complexity of the plant antioxidative system and identified several GSH-dependent enzymes that may play more direct roles in peroxide metabolism. GPX has long been known to be a player in H₂O₂ metabolism in mammalian cells, but only began to be seriously studied in plants following the description of sequences homologous to the animal enzymes in the 1990s. Described as glutathione hydroperoxidases, the plant GPXs are distinguished from animal GPXs in having an active site cysteine in place of selenocysteine (Eshdat et al., 1997), even though both selenocysteine- and cysteine-dependent GPXs are found in unicellular algae such as *Chlamydomonas* (Dayer et al., 2008). Genome sequencing has shown that plant GPXs are encoded by several genes (8 in Arabidopsis). Despite their current nomenclature, several independent studies have shown that the encoded enzymes prefer TRX as reductant and have comparatively low activity against

GSH (Herbette et al., 2002; Iqbal et al., 2006; Navrot et al., 2006). Thus, they might be considered to be TRX-dependent peroxidoredoxins, and so not strong candidates to account for GSSG accumulation *in vivo*. However, they are included in **Figure 1** because it cannot as yet be discounted that they make some contribution to the GSH oxidation that occurs during stress.

GLUTATHIONE S-TRANSFERASES (GST)

The GST superfamily is composed of 55 genes in Arabidopsis, including the *DHAR* sequences mentioned above (Dixon and Edwards, 2010). As well as the DHARs, the family is divided into several classes (zeta, theta, TCHQD, phi, tau, lambda), with the last three being specific to plants. The most numerous are the phi and tau classes, composed of 13 and 28 genes, respectively (Supplemental Table 1). Proteins that catalyze the classical conjugase reaction using GSH are found in several classes. At least some GSTs can also use GSH to reduce organic hydroperoxides (Cummins et al., 1999; **Figure 1**). Studies on the Arabidopsis proteins have revealed that several classes of GST include enzymes with both conjugase and peroxidase activities (Dixon et al., 2009; Dixon and Edwards, 2010). Enzymes of the lambda class are unusual in that they do not catalyze conjugase reactions. Like DHARs, they have an active-site cysteine and function as monomers (Dixon et al., 2002). They may generate GSSG by catalyzing the reduction of small molecules or, possibly, the deglutathionylation of protein cysteine residues (Dixon et al., 2002; Dixon and Edwards, 2010).

PEROXIREDOXINS (PRX)

These enzymes are classed into several types: 2-cys PRX, 1-cys PRX, type II PRX, and PRX Q (Dietz et al., 2002). The first

to be studied in plants was chloroplastic 2-Cys PRX, which can be regenerated by specific thioredoxins or by an NADPH-thioredoxin reductase (Dietz, 2003; Collin et al., 2004; Pulido et al., 2010). However, plants also contain several type II PRX that, once oxidized by peroxides or other compounds, can oxidize glutathione, particularly *via* glutaredoxins (GRX; **Figure 1**). Interactions between PRXII and GRX have been studied at the biochemical level in poplar and *Arabidopsis* (Rouhier et al., 2002; Bréhélin et al., 2003; Couturier et al., 2011; Riondet et al., 2012). PRXII are encoded by five expressed genes in *Arabidopsis*. While information is emerging, the identification of the GRXs that couple their re-reduction to GSH oxidation *in vivo* remains incomplete (Rouhier, 2010).

OTHER POSSIBILITIES

The reactions outlined above are not intended to be exhaustive. Numerous other routes could allow oxidation of GSH to GSSG. A comprehensive treatment of all of these is beyond the scope of this discussion. Among other possibilities of note is the reaction catalyzed by *S*-nitrosoglutathione (GSNO) reductase (**Figure 1**), which can produce GSSG from GSH and GSNO. Although this enzyme is receiving considerable attention for its role in various physiological functions (Sakamoto et al., 2002; Díaz et al., 2003; Barroso et al., 2006; Kwon et al., 2012), its capacity relative to enzymes such as DHAR is unclear. Adenosine phosphosulfate reductase (APR), a key chloroplastic enzyme in sulphate reduction, uses GSH as electron donor (Bick et al., 1998). The capacity of this enzyme is relatively low, although the activity may be stimulated by enhanced expression and post-translational activation in oxidative stress conditions, notably to produce cysteine for glutathione synthesis (Bick et al., 2001; Queval et al., 2009).

At least one type of plant methionine sulfoxide reductase activity may be coupled to GSH oxidation *via* glutathione-linked GRX (Tarrago et al., 2009). This enzyme regulates the oxidation state of protein methionine residues but based on its turnover rates (Tarrago et al., 2009), it is unlikely to make an appreciable contribution to increases in GSSG during oxidative stress. One interesting mechanism that could potentially contribute has been described as “proteome-dependent glutathione peroxidase” (Zaffagnini et al., 2012). This process, which could be stimulated under conditions of stress, envisages a chloroplastic sequence of reactions involving H_2O_2 -triggered *S*-glutathionylation of diverse available protein cysteine residues, followed by regeneration of the free cysteines by glutathione-dependent GRX (Zaffagnini et al., 2012). The net result would be reduction of H_2O_2 to two water molecules with oxidation of 2 GSH to GSSG, i.e., a GSH peroxidase reaction. Such a sequence may share mechanistic features with the PRXII-GRX pathway shown in **Figure 1**, a principal difference being that H_2O_2 would not react with a specific catalytic cysteine but rather in a more general way with free and reactive chloroplast protein cysteines. As yet, the physiological significance of this process is difficult to evaluate, although it has been noted that the abundance of potentially reactive cysteines in chloroplast proteins is far from negligible (Zaffagnini et al., 2012).

SUBCELLULAR COMPARTMENTATION

Supplemental Table 1 presents a list of *Arabidopsis* genes involved in the pathways shown in **Figure 1**. Given the relative

concentrations of different ROS, the battery of H_2O_2 -metabolizing enzymes potentially linked to glutathione, and the marked changes in glutathione status when other H_2O_2 -metabolizing enzymes such as catalase are down-regulated, the main focus of the following discussion concerns the enzymes that could be important in linking H_2O_2 or related peroxides to GSH oxidation to GSSG. Based on the above discussion, we suggest that the major candidates to perform this function are (1) DHARs, (2) GSTs, and (3) GRX-PRXII. The subcellular compartmentation of *Arabidopsis* proteins within these families is summarized in **Figure 2**.

While DHAR1 has been localized to the peroxisomes, DHAR2 is cytosolic and DHAR3 encodes a dual-addressed chloroplast/mitochondrial enzyme (**Figure 2**). These three genes are therefore sufficient to explain the presence of the ascorbate-glutathione cycle in these compartments (Foyer and Halliwell, 1977; Jiménez et al., 1997). Three type II PRX (PRXIIB, C, D) are found in the cytosol, with PRXIIIE and PRXIIF located in the chloroplast and mitochondrion, respectively (**Figure 2**; Rouhier and Jacquot, 2005; Tripathi et al., 2009).

Many GSTs are located in the cytosol, but several of these have also been detected in other compartments such as the chloroplast (**Figure 2**; Supplemental Table 1). The only types of GST that are not thought to be found in the cytosol are the theta class, encoded by three genes that direct the proteins to the peroxisome (Dixon et al., 2009). The GFP-fusion proteins of GSTU12 and GSTT3L were found to be localized in the nucleus (Dixon et al., 2009).

EVIDENCE FOR THE IMPORTANCE OF THE DIFFERENT PATHWAYS

BIOCHEMICAL DATA

DHA as oxidant

On the basis of modeling of ROS metabolism in the chloroplast, it was suggested that the ascorbate pool could operate largely

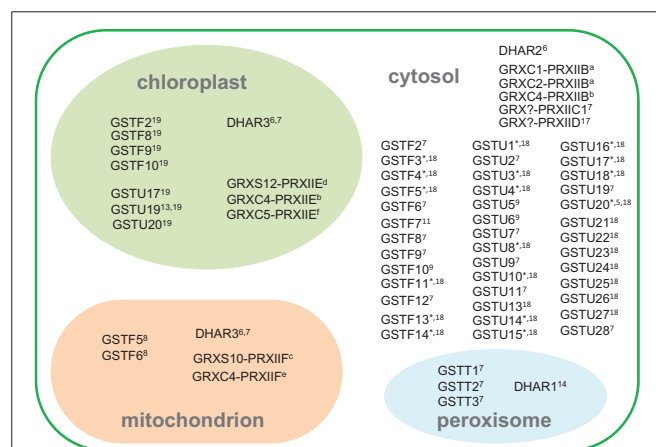


FIGURE 2 | Subcellular compartmentation of GSH-oxidizing enzymes, based on available information. Numbers and “*” indicate references given in Supplemental Table 1 except for the following, indicated in the figure by letters in superscript: ^aRiondet et al., 2012; ^bBréhélin et al., 2003; ^cFinkemeier et al., 2005; ^dGama et al., 2008; ^eRouhier et al., 2005; ^fCouturier et al., 2011. Abbreviations as in **Figure 1** legend. GRX-PRX partnerships are indicated for proteins shown to functionally interact in peroxidase activity, but these proteins may also interact with other partners.

independently of glutathione because most of the MDHA produced would be efficiently reduced to ascorbate, entailing the formation of little DHA (Polle, 2001). It was concluded that the chemical reaction with GSH would suffice to reduce the small amounts of DHA produced (Polle, 2001). It is possible that this situation is specific to the illuminated chloroplast.

Both the chemical and enzyme-dependent reduction of DHA can be easily detected *in vitro* by following the GSH-dependent production of ascorbate in the absence and presence of crude protein extract. The total enzyme-dependent leaf activity that can be measured in standard assay conditions is around 0.2–0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ total protein $\cdot\text{min}^{-1}$, which is typically about twice the total leaf GR activity but somewhat lower than extractable APX (e.g., Sen Gupta et al., 1993; Mhamdi et al., 2010b).

A protein purified from spinach by classical biochemical procedures, considered to be a cytosolic DHAR, had K_M values of 2.5 mM and 70 μM for GSH and DHA, respectively (Hossain and Asada, 1984). Analysis of a purified chloroplast protein produced similar values, although with a somewhat higher affinity for GSH (Shimaoka et al., 2000). Subsequent studies of recombinant DHARs from Arabidopsis, poplar, and rice produced similar maximal activities and K_M values to these preparations, although the organellar forms in Arabidopsis have a significantly lower affinity for GSH (Table 2). With the exception of values reported for the Arabidopsis enzymes, the K_M values for GSH are below or close to *in vivo* concentrations (Queval et al., 2011). Much of the DHA that can be measured in unstressed plant tissues is probably apoplastic (Foyer and Noctor, 2011) and concentrations are probably low in compartments that contain GSH (Polle, 2001). If so, oxidative stress-induced changes in DHA could be a major factor contributing to accelerated activity *in vivo*, at least in some compartments. Under conditions favoring accumulation of H_2O_2 , a second factor that could come into play is increases in DHAR abundance. The expression of some DHAR genes is increased by oxidative stress (discussed further in the next section).

GST activities

Although they have hydroperoxide activity, GSTs generally use H_2O_2 only at low rates (Mannervik, 1985). The physiological oxidants used by the different GSTs in plants remain in many cases to be identified, and studies of their biochemical activities frequently use the artificial substrate, cumene hydroperoxide. Specific GSTs have been purified from several species and their activities as conjugases or peroxidases compared (DeRidder et al., 2002; Cummins et al., 2003; Park et al., 2005; Nutricati et al., 2006; Yang et al., 2009). Such studies reveal that the K_M values of GSTs for GSH in conjugase reactions are generally below 2 mM. Some studies have compared the peroxidatic competence of several GSTs from the same species (Wagner et al., 2002; Dixon et al., 2009). Most notably, the detailed study of Dixon et al. (2009) reported that GSTs showing peroxidase activity are numerous and not limited to any class. Of 38 theta, phi, and tau class GSTs tested for GSH peroxidase activity against short-chain organic peroxides, only six were found to have undetectable activity (Table 3). Of the 32 with detectable peroxidase activity, most were also able to catalyze GSH conjugation to one or both of two model substrates (Dixon et al., 2009).

Table 2 | Kinetic properties of dehydroascorbate reductases from several plant species.

Name/ Subcellular localization	Max activity	GSH			DHA		
		K_M	k_{cat} (/10 ⁴)	k_{cat}/K_M (/10 ⁴)	K_M	k_{cat} (/10 ⁴)	k_{cat}/K_M (/10 ⁴)
PURIFIED FROM SPINACH LEAVES							
Cyt ^a	370	2.5	–	–	0.07	0.01	–
Chp ^b	360	1.1	–	–	0.07	0.03	–
Chp ^c	–	1.1	–	0.52	0.05	0.05	0.9
RECOMBINANT ARABIDOPSIS ENZYMES ^d							
DHAR1 Per	936	10	–	–	0.26	–	–
DHAR2 Cyt	120	–	–	–	–	–	–
DHAR3 Chp/Mit	264	10	–	–	0.50	–	–
RECOMBINANT POPLAR ENZYMES ^e							
DHAR1 Chp	53	3.8	9.9	2.7	0.07	1.3	18.8
DHAR2 Cyt	50	2.3	5.4	2.4	0.23	1.8	7.7
DHAR3 Cyt	38	2.5	4.1	1.7	0.48	2.1	4.4
RECOMBINANT RICE ENZYME ^f							
DHAR1 Cyt	350	1.0	–	–	0.35	–	–

Values are expressed in mM (K_M), s^{-1} (k_{cat}), $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (k_{cat}/K_M), and $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ (maximal activity). Chp, chloroplast. Cyt, cytosol. Mit, mitochondrion. Per, peroxisome.

References: ^aHossain and Asada, 1984; ^bShimaoka et al., 2000; ^cShimaoka et al., 2003; ^dDixon et al., 2002; ^eTang and Yang, 2013; ^fAmako et al., 2006.

Table 3 | Arabidopsis recombinant glutathione S-transferases shown to have GSH peroxidase activity *in vitro*.

PEROXIDATIC ACTIVITY						
T1 > U25 > T3 > T2 > U8 > U17 > U24 > F6 > F8 > U6 > U16 > U5 > F2 > F9 > U18 > U3 > U19 > U1 > U22 > F7 > U4 > F3 > U20 = U23 > U10 = U26 > U28 = U2 > U9 > U7 > U21 > U13						
PEROXIDATIC ACTIVITY NOT DETECTED						
F5	F14	U11	U12	U14	U27	
PEROXIDATIC ACTIVITY NOT TESTED						
F4	F13	F10	F11	F12	U15	

The enzymes for which peroxidatic activity was detected are listed in descending order of the activity measured on a unit protein basis against cumene hydroperoxide (Dixon et al., 2009).

Although 32 GSTs showed peroxidase activity *in vitro*, their specific activities varied considerably, the most active (GSTT1) having rates ~ 600 -fold higher than the least active (GSTU13). The relatively small theta class was the only one whose members were all found to be competent in GSH peroxidation. Together with the tau-type U25, these three GSTs showed the highest specific peroxidase activity (Table 3). Moreover, the theta class enzymes were active not only against cumene hydroperoxide but also against long-chain (C_{18}) fatty acid peroxides. This contrasted with U25, which was highly active only against the model peroxide (Dixon et al., 2009). Interestingly, the theta GSTs were shown to be localized in the peroxisomes (Figure 2), organelles that can have high rates of both peroxide generation and fatty acid metabolism.

Glutaredoxin-linked peroxiredoxins

The activity of recombinant poplar mitochondrial PRXIIIF against H_2O_2 and organic peroxides was measured in the presence of GSH and/or GRX (Gama et al., 2007). With *tert*-butyl hydroperoxide as oxidant, a K_M of 260 μM was obtained for GSH. However, the activity was considerably stimulated by the additional presence of poplar GRX C4 (Gama et al., 2007). Analysis of the chloroplastic PRXIIIE (Gama et al., 2008) revealed fairly similar properties, except that lower K_M peroxide and higher k_{cat} values produced somewhat higher catalytic efficiencies than for the mitochondrial protein (Table 4). In fact, the kinetic properties against peroxide of the glutathione-linked PRXIIIE were very similar to 2-cys PRX, which is also chloroplastic but glutathione-independent (Horling et al., 2003; Bernier-Villamor et al., 2004; Rouhier et al., 2004a,b; Gama et al., 2007). A study of the mitochondrial PRXIIIF from pea reported a similar K_M for H_2O_2 but significantly higher turnover values (Barranco-Medina et al., 2007). The K_M values for H_2O_2 of PRXII, 2-cys PRX and APX are quite similar, but the turnover rates of both types of PRX are significantly lower. Thus, k_{cat}/K_M values for PRX are about 100-fold below those measured for chloroplastic APX or, in the case of the pea PRXIIIE, over 10-fold lower (Table 4).

In terms of the capacity for GSH oxidation through GRX-PRXII compared to the ascorbate-glutathione pathway, it is interesting to compare the k_{cat} and k_{cat}/K_M values of PRXII and DHAR obtained when the respective oxidants (peroxide and DHA) were varied. Based on available data, the parameters for DHAR are about 20–1000-fold higher (compare Tables 2, 4). For equal amounts of protein, this indicates that DHAR should be more efficient, although the actual *in vivo* rates will be influenced by several factors, most obviously the relative abundance of the proteins and the *in vivo* concentrations of the respective oxidants in the compartments where the proteins are located.

Glutaredoxins can catalyze reduction of DHA *in vitro* (Wells et al., 1990). Arabidopsis GRXC1 and C2, which are competent in regeneration of PRXIIB, can also catalyze DHA reduction (Riondet et al., 2012). K_M values of the GRX for DHA were similar to DHAR but the k_{cat} values were only about 3 s^{-1} (Riondet

et al., 2012), several orders of magnitude lower than the DHARs (Table 2).

GENE EXPRESSION DURING OXIDATIVE STRESS

There have been many transcriptomic analyses of plants undergoing oxidative stress, conditions in which oxidation of GSH is expected to be accelerated. However, the number of such studies that have included data on glutathione status is more limited. These notably include Arabidopsis mutants deficient in the major leaf form of catalase (CAT2), in which conditionally increased H_2O_2 availability through photorespiration drives reproducible changes in GSSG:GSH (Mhamdi et al., 2010a). These increases in leaf GSSG are also observed, to a lesser extent, in knockout mutants for GR1, and are particularly marked in *cat2 gr1* double mutants lacking both enzymes (Figure 3). However, the processes that are responsible for GSSG accumulation when CAT2 function is lost remain unclear.

As a first step to investigating this question, we mined two Arabidopsis *cat2* microarray datasets for genes encoding the enzymes listed in Supplemental Table 1. The data on *cat2* were compared with responses to external H_2O_2 , ozone, and paraquat (Figure 4C) and to results obtained for the *flu* mutant, which generates excess singlet oxygen in the chloroplast (Figure 4D). Experimental details for all these microarray studies are given in Supplemental Table 2. The two datasets in Figures 4A,B come from different experiments performed on leaf rosette material from plants of different age (Mhamdi et al., 2010b; Queval et al., 2012). They were also obtained using two different microarray chips, and some probe sets were present on only one of the chips (Figure 4: absence of corresponding probe sets is indicated by white rows). Moreover, key factors determining the measured response to oxidative stress are likely to be exposure time and stress intensity. As well as other differences in plant growth conditions, the data shown in the different parts of Figure 4 were obtained after different exposure times, ranging from 1 h (H_2O_2 ; Figure 4C) to 4 days (Figures 4A,B, right column).

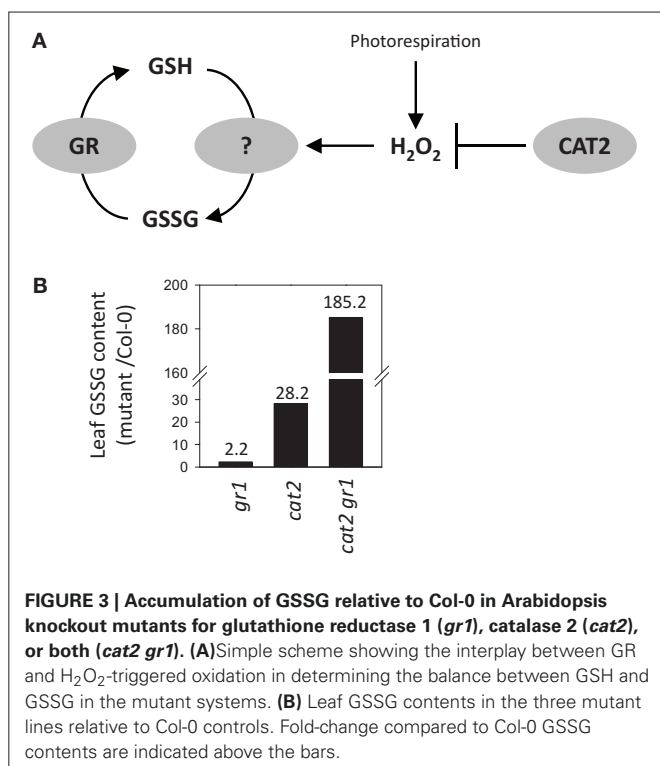
For all the above reasons, some divergence is expected between responses observed in the different datasets. Despite this, a number of genes within each family responded quite similarly to

Table 4 | Kinetic characteristics of glutaredoxin-dependent peroxiredoxins from poplar and pea.

Enzyme	Substrate		Peroxide			GSH	GrxC4
			K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mM^{-1}s^{-1}$)	K_M (mM)	K_M (μM)
Poplar PRXIIIF ^a	Mit	H_2O_2	0.07	0.38	5.3		
		<i>t</i> -BOOH	0.02	0.51	31.5	0.260	1.3
		CuOOH	0.33	0.39	1.2		
Pea PRXIIIF ^b	Mit	H_2O_2	0.02	10.6	560	ND	ND
Poplar PRXIIIE ^c	Chp	H_2O_2	0.02	0.57	26		
		<i>t</i> -BOOH	0.01	0.90	104	ND	0.51
Pea 2-Cys PRX ^d	Chp	H_2O_2	0.03	0.69	25	NA	NA
Spinach APX ^e	Chp	H_2O_2	0.03	290	9667	NA	NA

For comparison, data are shown for 2-cys peroxiredoxin from pea (*Pisum sativum*) and ascorbate peroxidase (APX) from spinach (*Spinacia oleracea*). *t*-BOOH, *tert*-butyl hydroperoxide. CuOOH, cumene hydroperoxide. ND, not determined. NA, not applicable.

References: ^aGama et al., 2007; ^bBarranco-Medina et al., 2007; ^cGama et al., 2008; ^dBernier-Villamor et al., 2004; ^eNakano and Asada, 1987.



the different oxidative stresses. Among the three DHARs, *DHAR2* was the most obviously responsive, being clearly induced in *cat2*, *flu*, and by external H_2O_2 or paraquat. Induction was less evident following ozone exposure (Figure 4). PRXIIC was the only GRX-linked PRX that was induced, though only in response to ozone. None of the *PRXII* genes were induced alongside GSSG accumulation in *cat2* (Figures 4A,B). In contrast, marked up-regulation of several *GSTs* was observed in most of the datasets. *GSTs* that responded to most of the treatments included F6 and F7, as well as many tau types, with U1, U4, U5, U6, U7, U8, U24, and U25 showing a particularly clear induction. Indeed, U24 and U25 are among the most strongly *cat2*-induced genes on a fold-change basis (Queval et al., 2012). Interestingly, U11, U12, and U13 were induced by all treatments except in *cat2* and *cat2 gr1* (Figure 4, compare A and B with C and D). This could indicate that these *GSTs* are involved in early responses to oxidative stress. In contrast to several phi and tau *GST* genes, none of the theta types were induced in any condition, despite their documented high peroxidase activity (Table 3). Little or no induction of *GSNOR* was apparent, while among the *GPX* sequences, *GPX5*, *GPX6*, and *GPX7* were most obviously responsive, although some variation was observed between the experiments, including the two *cat2* datasets.

This comparison points to numerous candidates that could play a role in oxidizing glutathione. For several reasons, however, the expression data remain at best indicative. First, increased transcripts may not feed through to an increase in protein abundance. Second, transcriptomic analyses do not identify other possible regulatory mechanisms that may operate during oxidative stress at the post-transcriptional or post-translational levels. Third, the data of Figure 4 show fold-changes compared to wild-type: even if

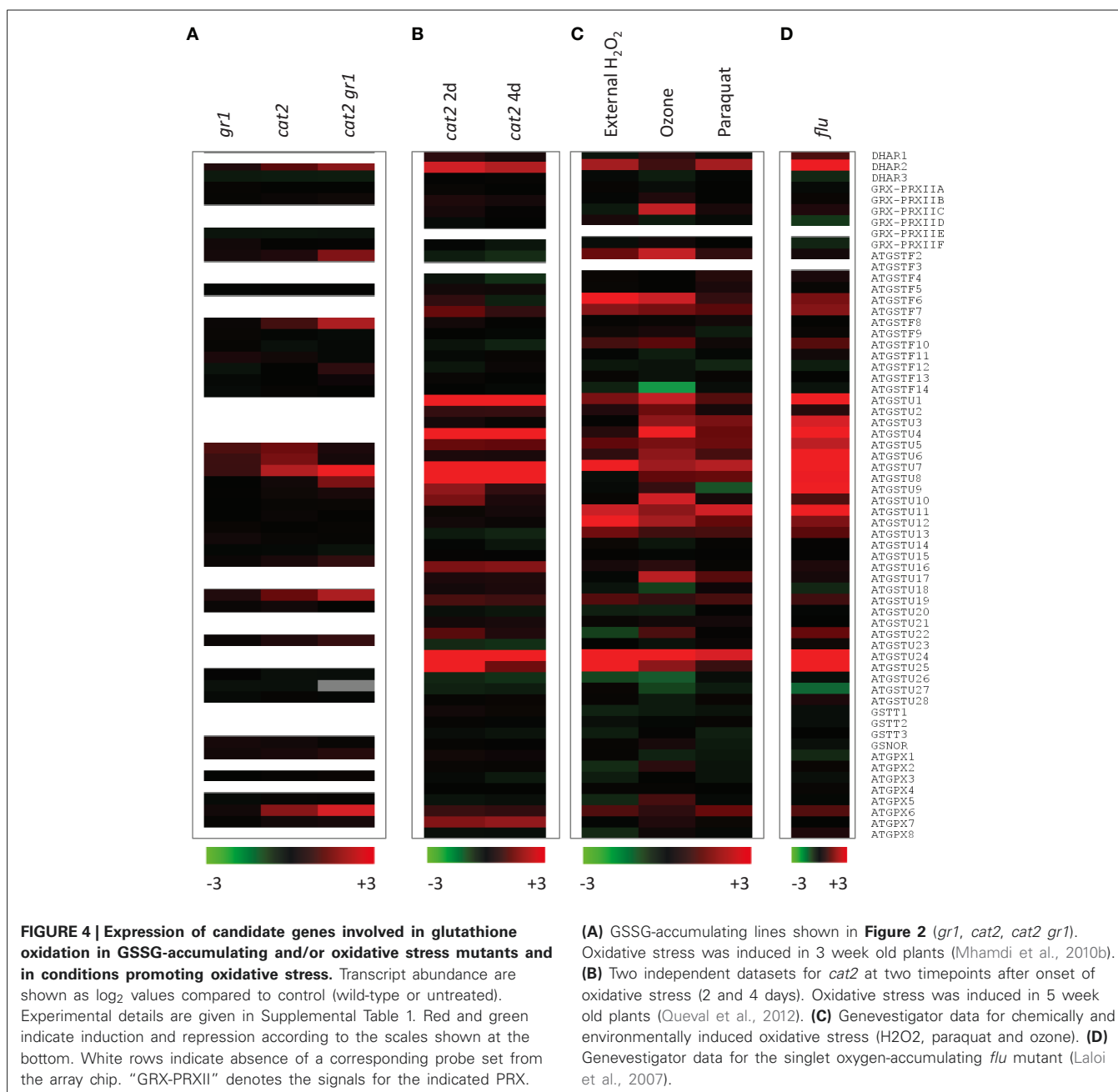
strongly induced at the protein level, low abundance enzymes may not make a marked contribution to GSH oxidation within the cellular context. Inversely, it is not possible to discount a role for an enzyme on the basis of lack of induction. Finally, even if transcript up-regulation feeds through to enhanced protein, some of the enzyme activities encoded by responsive genes shown in Figure 4 may not involve GSH oxidation. At least some of the *GSTs* are probably induced in connection with a conjugase function. For example, *GSTF6* has been implicated in the synthesis of camalexin (Su et al., 2011), a phytoalexin that can accumulate strongly in *cat2* in oxidative stress conditions (Chaouch et al., 2010). As noted above, *GPXs* may mainly if not exclusively catalyze peroxidation using TRX, not GSH.

With the above caveats in mind, useful pointers can be obtained by combining information from biochemical competence and efficiency (Tables 2–4) with responsiveness at the transcript level (Figure 4). Some examples of possible candidates identified according to these criteria would include *DHAR2*, *GSTU8*, *GSTU24*, and *GSTU25*. Interestingly, the proteins encoded by these genes are cytosolic (Figure 2), even though the initial location of oxidant generation in several of the studies shown in Figure 4 is expected to be mainly peroxisomal (*cat2*) or chloroplastic (paraquat, *flu*). The potential importance of cytosolic pathways in determining glutathione status in *cat2* has been previously noted (Mhamdi et al., 2010b).

GENETIC STUDIES

While the data discussed above provide useful information on biochemical properties and expression patterns, establishing the physiological importance of specific components will require other approaches such as reverse genetics. Gene-specific loss-of-function studies will be required to establish the contributions of particular enzymes to GSSG production. As yet, there is relatively little information on the response of glutathione pools in plants specifically deficient in the genes discussed above. A few studies in Arabidopsis have generated potentially relevant data. A preliminary analysis of a *dhar2* mutant reported that although DHA was somewhat increased compared to Col-0, GSSG levels were similar in the two lines (Yoshida et al., 2006). Loss of *PRXIIF* function had slight effects on root glutathione pools in control conditions, but little difference from wild-type was observed during stresses involving exposure to cadmium or to an inhibitor of the mitochondrial alternative oxidase (Finkemeier et al., 2005). Knockout Arabidopsis *gstu17* mutants that showed altered stress responses were reported to have increased root and shoot glutathione contents in unstressed conditions, although no data for glutathione redox state or glutathione contents during stress were presented (Chen et al., 2012).

While loss-of-function studies are a more incisive approach to establishing the roles of specific genes, overexpression studies can also provide useful indications of the potential importance of a given enzyme. Several studies have overexpressed genes encoding *GSTs*, *GPX*, or *DHAR*, often with the objective of improving plant stress tolerance. A comprehensive discussion of these studies is beyond the scope of the present review. Hence, we limit ourselves here to reports that have included effects on glutathione status in the overexpressing lines.



Tobacco knockdown and overexpressor DHAR lines showed a substantial decrease and increase in extractable foliar activity, respectively (Chen and Gallie, 2005). While the knockdown lines had decreased ascorbate and increased DHA, the opposite effect was observed in the overexpressors (Chen and Gallie, 2005). The GSH:GSSG ratio was lower in the knockdowns and higher in the overexpressors, with overexpression increasing GSH:GSSG from about 4 in the control plants to almost 20, an effect largely due to increased GSH rather than decreased GSSG (Chen and Gallie, 2005). Another study in tobacco also reported that overexpression of Arabidopsis *DHAR2* increased the reduction state of the ascorbate pool, an effect that was observed both in control

conditions and in response to aluminum stress (Yin et al., 2010). However, no difference in glutathione redox state between the control and overexpressors was observed in either condition. The authors concluded that GSH was not limiting for DHAR activity (Yin et al., 2010). Arabidopsis lines homologously overexpressing DHAR have also been described (Wang et al., 2010). Alongside improved stress tolerance, these plants had increased total pools of ascorbate and glutathione, both in control and stress conditions (high temperature, paraquat; Wang et al., 2010).

The picture that emerges from these studies is complex. If the reaction is considered in isolation, a negative relationship between the GSH:GSSG ratio and DHAR activity would be

predicted, because the enzyme consumes GSH and produces GSSG. So far, there is little evidence that this relationship is observed in plants with genetically altered DHAR capacity. The reported increases in total glutathione and GSH:GSSG in tobacco and *Arabidopsis* overexpressor lines could be partly related to the need for enhanced GSH to support increased DHAR activity (Chen and Gallie, 2005; Wang et al., 2010). Thus, the effects of genetic manipulation of DHAR may not be limited to direct effects on GSH:GSSG ratios, e.g., because the plant may also respond by increasing glutathione synthesis. Another complication could be that altering the capacity of a single antioxidative enzyme may produce indirect effects on ROS availability that then alter the flux through other pathways that oxidize GSH, thus masking more direct effects.

Glutathione status was also assessed in tobacco lines overexpressing a GST with GSH peroxidase activity (Roxas et al., 2000). These lines showed enhanced tolerance to salt. Both in control and salt-stressed conditions, GST overexpression caused a more than three-fold increase in GSSG relative to control plants. This study therefore revealed that enhanced GST expression, which is a feature of oxidative stress responses (Figure 4), is able to decrease the reduction state of glutathione *in vivo*. It also reported the operation of secondary effects within the antioxidant system. Increased GSSG was associated with enhanced activities of ascorbate-glutathione pathway enzymes such as APX and MDHAR (Roxas et al., 2000).

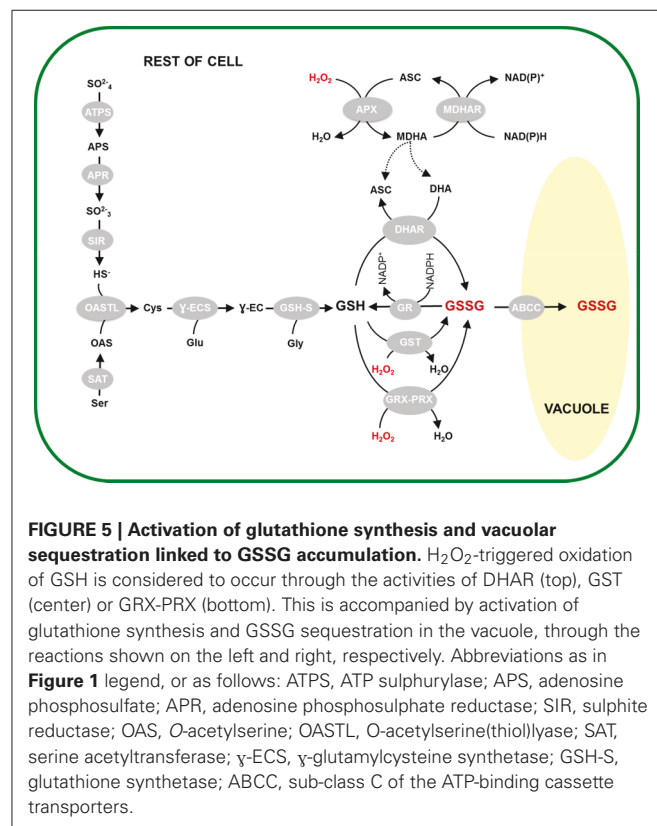
MODIFICATIONS OF GLUTATHIONE STATUS ASSOCIATED WITH GSSG ACCUMULATION

Why does GSSG accumulate during oxidative stress? Given the existence of opposing GSH oxidation and GSSG reduction activities, such accumulation is unlikely to be a simple result of conversion of GSH to GSSG. Rather, it is probably more accurately viewed as the net outcome of oxidation outpacing reduction, even if only slightly. As a simple hypothetical example: if enhanced H_2O_2 drives oxidation of 2 GSH to GSSG at $20 \text{ nmol.g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$ (which even if one considers only DHAR as a source of GSSG is no more than 1% of typical capacities measured *in vitro*) but the *in vivo* GR activity is 1% slower ($19.8 \text{ nmol.g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$; about 2% of typical *in vitro* capacities), the two rates would entail a net accumulation of about $0.3 \mu\text{mol.GSSG g}^{-1} \text{FW}$ in 24 h. GSSG accumulation of this magnitude can be observed in catalase-deficient plants following transfer to oxidative stress conditions. The above calculation is obviously simplistic as the rates of the two reactions will vary as a function of changes in substrate concentrations following the onset of stress, and kinetic modeling would be required to examine the question more closely. It is intended merely to illustrate that slightly lower activity of GSSG reduction compared to GSH oxidation may be one factor driving a drop in the GSH: GSSG ratio *in vivo*.

In many cases, stress-induced GSSG accumulation in plants does not occur at the expense of decreased GSH. Rather, the GSH pool remains rather constant while even marked increases in total glutathione are almost entirely due to the accumulation of GSSG (Smith et al., 1985; Willekens et al., 1997; Mhamdi et al., 2010a). Available data suggest that this involves at least two processes additional to redox cycling between GSH and GSSG. The first is

increased GSH neosynthesis as a result of processes that probably involve activation of cysteine and glutathione production at transcriptional and post-translational levels (Bick et al., 2001; Hicks et al., 2007; Gromes et al., 2008; Queval et al., 2009). The second is a marked change in glutathione compartmentation, with GSSG accumulation occurring particularly in the vacuole (Queval et al., 2011). This second process means that the GSH:GSSG ratio measured in tissue or whole cell extracts does not report on the actual glutathione status in specific compartments but is rather a composite value of GSH:GSSG ratios, which may differ widely between different subcellular locations (Noctor et al., 2013). For example, the cytosolic glutathione pool may well be less oxidized than that measured in extracts because a substantial amount of the GSSG generated by oxidative stress is shipped to the vacuole, possibly by ABCC transporters (Martinoia et al., 1993; Lu et al., 1998). This does not necessarily invalidate the GSSG:GSH ratio as a useful oxidative stress marker, because accumulation at sites such as the vacuole is predicted to be dependent on GSSG accumulation in other compartments caused by the oxidant-driven imbalance discussed above.

Figure 5 presents an overview that attempts to integrate some of the different processes that are likely to be involved in oxidative stress-driven changes in glutathione status. As well as GR activity, oxidation by the three main pathways we have discussed in this review is situated within the context of glutathione synthesis and the vacuolar sequestration of a substantial part of the GSSG that is generated. It is noteworthy that the vacuole is not the only compartment in which GSSG is highly enriched during oxidative stress. Marked accumulation of GSSG also seems to occur in



the chloroplast. This has been reported in two independent studies of catalase-deficient plants using different techniques, despite the fact that the initial increase in H_2O_2 availability in these systems is expected to be extra-chloroplastic (Smith et al., 1985; Queval et al., 2011). While GSSG import from the cytosol cannot be completely discounted, the most influential process may be oxidation of GSH within the chloroplast (Noctor et al., 2013). Whatever the mechanisms, oxidation of GSH and/or accumulation of GSSG in the chloroplast may have consequences for thiol-dependent reactions in this compartment. These include regulation of chloroplast proteins by S-glutathionylation reactions or the TRX system (Dixon et al., 2005; Michelet et al., 2005; Zaffagnini et al., 2012) as well as activation of synthesis pathways that contribute to the accumulation of total glutathione in these conditions (Figure 5).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The post-genomics era has witnessed a dramatic increase in our understanding of plant antioxidative systems. Work over the last decade has also underscored their complexity. The present discussion has attempted to emphasize that a multiplicity of reactions may contribute to GSH oxidation during oxidative stress, leading to modifications in the status of this potentially important cellular redox signal. Whatever the reactions involved, the resulting changes in GSH:GSSG triggered by oxidants such as H_2O_2 may be signaled to sensitive proteins by catalysts such as certain GRX. Alternatively, the oxidation of certain thiol-dependent peroxidases, including some we have mentioned here, may itself act as a signal or signal relay independent of “bulk-phase” changes in GSH:GSSG.

While DHAR function in the ascorbate-glutathione pathway remains an outstanding candidate as a GSSG-generating enzyme, data from biochemical, transcriptomic and reverse genetics studies all suggest that other enzymes may contribute. The potential for redundancy between different enzyme classes is evident. It is also possible that considerable genetic redundancy exists within enzyme classes, both in peroxide removal and in GSH oxidation. This is most obviously apparent for the large GST family. Moreover, identification of the enzymes specifically involved in GSH oxidation using targeted loss-of-function studies may be complicated by the existence of different pathways that are able to replace or compensate for one another.

Despite these complexities, establishing the importance of the pathways able to generate GSSG from GSH *in planta* should be favored by the wide range of gene-specific mutants now available in Arabidopsis and other species. Kinetic modeling could also be useful to evaluate interactions between different reactions, and to define the limits of a system in which numerous components may act in parallel. A key issue could be (sub)cellular compartmentation, both of the reactions that cause GSH oxidation and of the GSSG that accumulates as a result. GSH-oxidizing processes may be condition-specific, with some reactions being more important in certain stresses than in others. Other issues that will need to be taken into account are the stage of plant development as well as modulating environmental conditions such as photoperiod, factors that may impose different patterns of gene expression in response to oxidative stress.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fpls.2013.00477/abstract>

REFERENCES

- Amako, K., Ushimaru, T., Ishikawa, A., Ogishi, Y., Kishimoto, R., and Goda, K. (2006). Heterologous expression of dehydroascorbate reductase from rice and its application to determination of dehydroascorbate concentrations. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 52, 89–95. doi: 10.3177/jnsv.52.89
- Asada, K., and Takahashi, M. (1987). “Production and scavenging of active oxygen species in photosynthesis,” in *Photoinhibition*, eds D. Kyle, C. Osmond, and C. Arntzen (New York, NY: Elsevier Science Publishers), 227–287.
- Barranco-Medina, S., Krell, T., Finkemeier, I., Sevilla, F., Lázaro, J. J., and Dietz, K. J. (2007). Biochemical and molecular characterization of the mitochondrial peroxidoredoxin PsPrxII F from *Pisum sativum*. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 729–739. doi: 10.1016/j.plaphy.2007.07.017
- Barroso, J. B., Corpas, F. J., Carreras, A., Rodríguez-Serrano, M., Esteban, F. J., Fernández-Ocaña, A., et al. (2006). Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J. Exp. Bot.* 57, 1785–1793. doi: 10.1093/jxb/erj175
- Bernier-Villamor, L., Navarro, E., Sevilla, F., and Lázaro, J. J. (2004). Cloning and characterization of a 2-Cys peroxidoredoxin from *Pisum sativum*. *J. Exp. Bot.* 55, 2191–2199. doi: 10.1093/jxb/erh238
- Bick, J. A., Aslund, F., Chen, Y., and Leustek, T. (1998). Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5'-adenylylsulfate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8404–8409. doi: 10.1073/pnas.95.14.8404
- Bick, J. A., Setterdahl, A. T., Knaff, D. B., Chen, Y., Pitcher, L. H., Zilinskas, B. A., et al. (2001). Regulation of the plant-type 5'-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress. *Biochemistry* 40, 9040–9048. doi: 10.1021/bi010518v
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., and Saran, M. (1990). “Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies,” in *Oxygen Radicals in Biological Systems: Oxygen Radicals and Antioxidants, Methods in Enzymology*, Vol. 186, eds L. Packer and A. N. Glazer (New York, NY: Elsevier Science Publishers), 343–355. doi: 10.1016/0076-6879(90)86128-I
- Bréhélin, C., Meyer, E. H., de Souris, J. P., Bonnard, G., and Meyer, Y. (2003). Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxidoredoxins: similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. *Plant Physiol.* 132, 2045–2057. doi: 10.1104/pp.103.022533
- Cairns, N. G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C. S., and Meyer, A. J. (2006). Maturation of Arabidopsis seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol.* 141, 446–455. doi: 10.1104/pp.106.077982
- Chaouch, S., Queval, G., Vanderauwera, S., Mhamdi, A., Vandorpe, M., Langlois-Meurinne, M., et al. (2010). Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 in a daylength-related manner. *Plant Physiol.* 153, 1692–1705. doi: 10.1104/pp.110.153957
- Chen, J. H., Jiang, H. W., Hsieh, E. J., Chen, H. Y., Chien, C. T., Hsieh, H. L., et al. (2012). Drought and salt stress tolerance of an Arabidopsis glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. *Plant Physiol.* 158, 340–351. doi: 10.1104/pp.111.181875
- Chen, Z., and Gallie, D. R. (2005). Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance. *Plant Physiol.* 138, 1673–1689. doi: 10.1104/pp.105.062000
- Chew, O., Whelan, J., and Millar, A. H. (2003). Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J. Biol. Chem.* 278, 46869–46877. doi: 10.1074/jbc.M307525200
- Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Dietz, K. J., et al. (2004). Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new γ -type. *Plant Physiol.* 136, 4088–4095. doi: 10.1104/pp.104.052233
- Couturier, J., Ströher, E., Albetel, A. N., Roret, T., Muthuramalingam, M., Tarrago, L., et al. (2011). Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin C5 as a model to explore molecular determinants for iron-sulfur cluster binding into glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* 286, 27515–27527. doi: 10.1074/jbc.M111.228726

- Cummins, I., Cole, D. J., and Edwards, R. (1999). A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J.* 18, 285–292. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00452.x
- Cummins, I., Hagan, D. O., Jablonkai, I., Cole, D. J., Hehn, A., Werck-Reichhart, D., et al. (2003). Cloning, characterization and regulation of family of phi class glutathione transferases from wheat. *Plant Mol. Biol.* 52, 591–603. doi: 10.1023/A:1024858218804
- Dayer, R., Fischer, B. B., Eggen, R. I. L., and Lemaire, S. D. (2008). The peroxidoreductase and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 179, 41–57. doi: 10.1534/genetics.107.086041
- DeRidder, B. P., Dixon, D. P., Beussman, D. J., Edwards, R., and Goldsbrough, P. B. (2002). Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners. *Plant Physiol.* 130, 1497–1505. doi: 10.1104/pp.010066
- Dghim, A. A., Mhamdi, A., Vaultier, M. V., Hasenfratz-Sauder, M. P., Le Thiec, D., Dizengremel, P., et al. (2013). Analysis of cytosolic isocitrate dehydrogenase and glutathione reductase 1 in photoperiod-influenced responses to ozone using *Arabidopsis* knockout mutants. *Plant Cell Environ.* 36, 1981–1991. doi: 10.1111/pce.12104
- Díaz, M., Achkor, H., Titarenko, E., and Martínez, M. C. (2003). The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Lett.* 543, 136–139. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00426-5
- Dietz, K. J. (2003). Plant peroxidoreductases. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 93–107. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134934
- Dietz, K. J., Horling, F., König, J., and Baier, M. (2002). The function of the chloroplast 2-cysteine peroxidoreductase in peroxide detoxification and its regulation. *J. Exp. Bot.* 53, 1321–1329. doi: 10.1093/jxb/53.372.1321
- Di Mascio, P., Kaiser, S., and Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 532–538. doi: 10.1016/0003-9861(89)90467-0
- Dipierro, S., and Borranccino, G. (1991). Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochemistry* 30, 427–429. doi: 10.1016/0031-9422(91)83698-K
- Dixon, D. P., Davis, B. G., and Edwards, R. (2002). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277, 30859–30869. doi: 10.1074/jbc.M202919200
- Dixon, D. P., and Edwards, R. (2010). “Glutathione S-transferases,” in *The Arabidopsis Book* (Rockville, MD: American Society of Plant Biologists). Available online at: <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.
- Dixon, D. P., Hawkins, T., Hussey, P. J., and Edwards, R. (2009). Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *J. Exp. Bot.* 60, 1207–1218. doi: 10.1093/jxb/ern365
- Dixon, D. P., Skipsey, M., Grundy, N. M., and Edwards, R. (2005). Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138, 2233–2244. doi: 10.1104/pp.104.058917
- Edwards, E. A., Rawsthorne, S., and Mullineaux, P. M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180, 278–284. doi: 10.1007/BF00194008
- Edwards, R., Blount, J. W., and Dixon, R. A. (1991). Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures. *Planta* 184, 403–409. doi: 10.1007/BF00195343
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., and Ben-Hayyim, G. (1997). Plant glutathione peroxidases. *Physiol. Plant.* 100, 234–240. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb04779.x
- Finkemeier, I., Goodman, M., Lamkemeyer, P., Kandlbinder, A., Sweetlove, L. J., and Dietz, K. J. (2005). The mitochondrial type II peroxidoreductase F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress. *J. Biol. Chem.* 280, 12168–12180. doi: 10.1074/jbc.M413189200
- Foyer, C. H., and Halliwell, B. (1977). Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry* 16, 1347–1350. doi: 10.1016/S0031-9422(00)88779-8
- Foyer, C. H., and Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155, 2–18. doi: 10.1104/pp.110.167569
- Gama, F., Bréhélin, C., Gelhaye, E., Meyer, Y., Jacquot, J. P., Rey, P., et al. (2008). Functional analysis and expression characteristics of chloroplastic Prx IIE. *Plant Physiol.* 133, 599–610. doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01097.x
- Gama, F., Keech, O., Eymery, F., Finkemeier, I., Gelhaye, E., Gardeström, P., et al. (2007). The mitochondrial type II peroxidoreductase from poplar. *Physiol. Plant.* 129, 196–206. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00785.x
- Gomez, L., Vanacker, H., Buchner, P., Noctor, G., and Foyer, C. H. (2004). The intercellular distribution of glutathione synthesis and its response to chilling in maize. *Plant Physiol.* 134, 1662–1671. doi: 10.1104/pp.103.033027
- Gromes, R., Hothorn, M., Lenherr, E. D., Rybin, V., Sheffzke, K., and Rausch, T. (2008). The redox switch of γ -glutamylcysteine ligase via a reversible monomer-dimer transition is a mechanism unique to plants. *Plant J.* 54, 1063–1075. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03477.x
- Grzama, A., Tennstedt, P., Clemens, S., Hell, R., and Meyer, A. J. (2006). Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione moiety by phytochelatin synthase. *FEBS Lett.* 580, 6384–6390. doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.050
- Han, Y., Mhamdi, A., Chaouch, S., and Noctor, G. (2013a). Regulation of basal and oxidative stress-triggered jasmonic acid-related gene expression by glutathione. *Plant Cell Environ.* 36, 1135–1146. doi: 10.1111/pce.12048
- Han, Y., Chaouch, S., Mhamdi, A., Queval, G., Zechmann, B., and Noctor, G. (2013b). Functional analysis of *Arabidopsis* mutants points to novel roles for glutathione in coupling H_2O_2 to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 2106–2121. doi: 10.1089/ars.2012.5052
- Hausladen, A., and Kunert, K. J. (1990). Effects of artificially enhanced levels of ascorbate and glutathione on the enzymes monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase, and glutathione reductase in spinach (*Spinacia oleracea*). *Plant Physiol.* 79, 384–388. doi: 10.1111/j.1399-3054.1990.tb06757.x
- Herbette, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J. L., Drevet, J. R., and Roedel-Drevet, P. (2002). Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *Eur. J. Biochem.* 269, 2414–2420. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02905.x
- Hicks, L. M., Cahoon, R. E., Bonner, E. R., Rivard, R. S., Sheffield, J., and Jez, J. M. (2007). Thiol-based regulation of redox-active glutamate-cysteine ligase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19, 2653–2661. doi: 10.1105/tpc.107.052597
- Horling, F., Lamkemeyer, P., König, J., Finkemeier, I., Kandlbinder, A., Baier, M., et al. (2003). Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxidoreductase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131, 317–325. doi: 10.1104/pp.010017
- Hossain, M. A., and Asada, K. (1984). Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterisation as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol.* 25, 85–92.
- Iqbal, A., Yabuta, Y., Takeda, T., Nakano, Y., and Shigeoka, S. (2006). Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* 273, 5589–5597. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05548.x
- Jiménez, A., Hernández, J. A., del Río, L., and Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114, 275–284.
- Jubany-Mari, T., Alegre-Batlle, L., Jiang, K., and Feldman, L. J. (2010). Use of a redox-sensing GFP (c-roGFP1) for real-time monitoring of cytosol redox status in *Arabidopsis thaliana* water-stressed plants. *FEBS Lett.* 584, 889–897. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.014
- Kataya, A. M. R., and Reumann, S. (2010). *Arabidopsis* glutathione reductase 1 is dually targeted to peroxisomes and the cytosol. *Plant Signal Behav.* 5, 171–175. doi: 10.4161/psb.5.2.10527
- Kwon, E., Feechan, A., Yun, B.-W., Hwang, B.-H., Pallas, J. A., Kang, G.-J., et al. (2012). AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*. *Planta* 236, 887–900. doi: 10.1007/s00425-012-1697-8
- Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I., and Apel, K. (2007). Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 672–677. doi: 10.1073/pnas.0609063103
- Lu, Y. P., Li, Z. S., Drozdowicz, Y. M., Hörtensteiner, S., Martinoia, E., and Rea, P. A. (1998). AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell* 10, 267–282.
- Mannervik, B. (1985). Glutathione peroxidases. *Meths. Enzymol.* 113, 490–495. doi: 10.1016/S0076-6879(85)13063-6

- Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K., and Amrhein, N. (1993). ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364, 247–249. doi: 10.1038/364247a0
- Marty, L., Siala, W., Schwarzländer, M., Fricker, M. D., Wirtz, M., Sweetlove, L. J., et al. (2009). The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 9109–9114. doi: 10.1073/pnas.0900206106
- Meyer, A. J. (2008). The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J. Plant Physiol.* 165, 1390–1403. doi: 10.1016/j.jplph.2007.10.015
- Meyer, A. J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J. P., et al. (2007). Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J.* 52, 973–986. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03280.x
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., and Noctor, G. (2010a). Catalase in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* 61, 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282
- Mhamdi, A., Hager, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Taconnat, L., et al. (2010b). *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE 1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular H₂O₂ and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol.* 153, 1144–1160. doi: 10.1104/pp.110.153767
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Marchand, C., Collin, V., Decottignies, P., Tsan, P., et al. (2005). Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16478–16483. doi: 10.1073/pnas.0507498102
- Nakano, Y., and Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.* 28, 131–140.
- Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., et al. (2006). Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stress. *Plant Physiol.* 142, 1364–1379. doi: 10.1104/pp.106.089458
- Nishizawa, A., Yabuta, A., and Shigeoka, S. (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* 147, 1251–1263. doi: 10.1104/pp.108.122465
- Noctor, G., Mhamdi, A., Queval, G., and Foyer, C. H. (2013). Regulating the redox gatekeeper: vacuolar sequestration puts glutathione disulfide in its place. *Plant Physiol.* 163, 665–671. doi: 10.1104/pp.113.223545
- Nutricati, E., Miceli, A., Blando, F., and De Bellis, L. (2006). Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases. *Plant Cell Rep.* 25, 997–2005. doi: 10.1007/s00299-006-0146-1
- Park, H. J., Cho, H. Y., and Kong, K. H. (2005). Purification and biochemical properties of glutathione S-transferase from *Lactuca sativa*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 232–237. doi: 10.5483/BMBRep.2005.38.2.232
- Polle, A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling: computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 126, 445–462. doi: 10.1104/pp.126.1.445
- Pulido, P., Spínola, M. C., Kirchsteiger, K., Guinea, M., Pascual, M. B., Sahrwaw, M., et al. (2010). Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *J. Exp. Bot.* 61, 4043–4054. doi: 10.1093/jxb/erq218
- Queval, G., Jaillard, D., Zechmann, B., and Noctor, G. (2011). Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ.* 34, 21–32. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02222.x
- Queval, G., Neukermans, J., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., and Noctor, G. (2012). Day length is a key regulator of transcriptomic responses to both CO₂ and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 35, 374–387. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02368.x
- Queval, G., Thominet, D., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Gakière, B., and Noctor, G. (2009). H₂O₂-activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Mol. Plant* 2, 344–356. doi: 10.1093/mp/ssp002
- Riondet, C., Desouris, J. P., Montoya, J. G., Chartier, Y., Meyer, Y., and Reichheld, J. P. (2012). A dicotyledon-specific glutaredoxin GRXC1 family with dimer-dependent redox regulation is functionally redundant with GRXC2. *Plant Cell Environ.* 35, 360–373. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02355.x
- Rizhsky, L., Hallak-Herr, E., Van Breusegem, F., Rachmilevitch, S., Barr, J. E., Rodermerl, S., et al. (2002). Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J.* 32, 329–342. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01427.x
- Rouhier, N. (2010). Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytol.* 186, 365–372. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03146.x
- Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J. P. (2004a). Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 1266–1277. doi: 10.1007/s00018-004-3410-y
- Rouhier, N., Gelhaye, E., Corbier, C., and Jacquot, J. P. (2004b). Active site mutagenesis and phospholipid hydroperoxide reductase activity of poplar type II peroxiredoxin. *Physiol. Plant.* 120, 57–62. doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0203.x
- Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J. P. (2002). Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 277, 13609–13614. doi: 10.1074/jbc.M111489200
- Rouhier, N., and Jacquot, J. P. (2005). The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1413–1421. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.037
- Rouhier, N., Villarejo, A., Srivastava, M., Gelhaye, E., Keech, O., Droux, M., et al. (2005). Identification of plant glutaredoxin targets. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 919–929. doi: 10.1089/ars.2005.7.919
- Roxas, V. P., Lodhi, S. A., Garrett, D. K., Mahan, J. R., and Allen, R. D. (2000). Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41, 1229–1234. doi: 10.1093/pcp/pcd051
- Sakamoto, A., Ueda, M., and Morikawa, H. (2002). *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett.* 515, 20–24. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02414-6
- Schwarzländer, M., Fricker, M. D., Müller, C., Marty, L., Brach, T., Novak, J., et al. (2008). Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J. Microsc.* 231, 299–316. doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02030.x
- Sen Gupta, A., Alscher, R. G., and McCune, D. (1991). Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiol.* 96, 650–655. doi: 10.1104/pp.96.2.650
- Sen Gupta, A., Webb, R. P., Holaday, S., and Allen, R. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. *Plant Physiol.* 103, 1067–1073.
- Shimaoka, T., Miyake, C., and Yokota, A. (2003). Mechanism of the reaction catalyzed by dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 270, 921–928. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03452.x
- Shimaoka, T., Yokota, A., and Miyake, C. (2000). Purification and characterization of chloroplast dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* 41, 1110–1118. doi: 10.1093/pcp/pcd035
- Smith, I. K., Kendall, A. C., Keys, A. J., Turner, J. C., and Lea, P. J. (1985). The regulation of the biosynthesis of glutathione in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci.* 41, 11–17. doi: 10.1016/0168-9452(85)90059-7
- Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., et al. (2011). Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 364–380. doi: 10.1105/tpc.110.079145
- Tang, Z. X., and Yang, H. L. (2013). Functional divergence and catalytic properties of dehydroascorbate reductase family proteins from *Populus tomentosa*. *Mol. Biol. Rep.* 40, 5105–5114. doi: 10.1007/s11033-11013-2612-5
- Tarrago, L., Laugier, E., Zaffagnini, M., Marchand, C., Le Maréchal, P., Rouhier, N., et al. (2009). Regeneration mechanisms of *Arabidopsis thaliana* methionine sulfoxide reductases B by glutaredoxins and thioredoxins. *J. Biol. Chem.* 284, 18963–18971. doi: 10.1074/jbc.M109.015487
- Tripathi, B. N., Bhatt, I., and Dietz, K. J. (2009). Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma* 235, 3–15. doi: 10.1007/s00709-009-0032-0
- Urano, J., Nakagawa, T., Maki, Y., Masumura, T., Tanaka, K., Murata, N., et al. (2000). Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Lett.* 466, 107–111. doi: 10.1016/S0014-5793(99)01768-8
- Vanacker, H., Carver, T. L. W., and Foyer, C. H. (2000). Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol.* 123, 1289–1300. doi: 10.1104/pp.123.4.1289

- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D. P., and Mauch, F. (2002). Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione *S*-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* 49, 515–532. doi: 10.1023/A:1015557300450
- Wang, Z., Xiao, Y., Chen, W., Tang, K., and Zhang, L. (2010). Increased vitamin C content accompanied by an enhanced recycling pathway confers oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *J. Integr. Plant Biol.* 52, 400–409. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00921.x
- Wells, W. W., Xu, D. P., Yang, Y., and Rocque, P. A. (1990). Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J. Biol. Chem.* 265, 15361–15364.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., et al. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C₃ plants. *EMBO J.* 16, 4806–4816. doi: 10.1093/emboj/16.16.4806
- Winterbourn, C. C. (2013). The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* 528, 3–25. doi: 10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X
- Yang, X., Sun, W., Liu, J. P., Liu, Y. J., and Zeng, Q. Y. (2009). Biochemical and physiological characterization of a tau class glutathione transferase from rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiol. Biochem.* 47, 1061–1068. doi: 10.1016/j.plaphy.2009.07.003
- Yin, L., Wang, S., Eltayeb, A. E., Uddin, M. I., Yamamoto, Y., Tsuji, W., et al. (2010). Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. *Planta* 231, 609–621. doi: 10.1007/s00425-009-1075-3
- Yoshida, S., Tamaoki, M., Shikano, T., Nakajima, N., Ogawa, D., Ioki, M., et al. (2006). Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for ozone tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 47, 304–308. doi: 10.1093/pcp/pci246
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Lemaire, S. D., and Trost, P. (2012). The emerging roles of protein glutathionylation in chloroplasts. *Plant Sci.* 185–186, 86–96. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.01.005

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 20 September 2013; paper pending published: 30 October 2013; accepted: 04 November 2013; published online: 25 November 2013.

Citation: Rahantaniaina M-S, Tuzet A, Mhamdi A and Noctor G (2013) Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants? *Front. Plant Sci.* 4:477. doi: 10.3389/fpls.2013.00477

This article was submitted to *Plant Physiology*, a section of the journal *Frontiers in Plant Science*.

Copyright © 2013 Rahantaniaina, Tuzet, Mhamdi and Noctor. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplemental Table 1. List of Arabidopsis genes encoding candidates for oxidizing glutathione. DHA, dehydroascorbate. GPX, glutathione peroxidase. GSNO(R), *S*-nitrosoglutathione (reductase). GST, glutathione *S*-transferase. ROOH, peroxide. Chp, chloroplast. Cyt, cytosol. CW, cell wall. Mit, mitochondrion. Nuc, nucleus. Per, peroxisome. PM, plasmamembrane. Vac, vacuole.

Enzyme	AGI code	Oxidant	Subcellular localization
Dehydroascorbate reductase		DHA	
DHAR1	At1g19570		Per ¹⁴
DHAR2	At1g75270		Cyt ⁶
DHAR3	At5g16710		Chp/Mit ^{6,7}
Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin		H ₂ O ₂ , ROOH	
GRX-PRXIIA	At1G65990		Not expressed ¹⁵
GRX-PRXIIB	At1G65980		Cyt ¹⁷
GRX-PRXIIC	At1G65970		Cyt ¹⁷
GRX-PRXIID	At1G60740		Cyt ¹⁷
GRX-PRXIIE	At3g52960		Chp ¹⁷
GRX-PRXIIF	At3g06050		Mit ¹⁷
Glutathione S-transferase		ROOH	
GSTF2	At4g02520		PM ¹⁶ /Cyt ⁷ /Chp ¹⁹ /Vac ⁴
GSTF3	At2g02930		Cyt ^{*,18} /PM ²
GSTF4	At1g02950		Cyt ^{*,18}
GSTF5	At1g02940		Cyt ^{*,18} /Mit ⁸
GSTF6	At1g02930		Cyt ⁷ / Mit ⁸ /Vac ⁴
GSTF7	At1g02920		Cyt ¹¹ / Nuc ¹¹ /Vac ⁴
GSTF8	At2g47730		Cyt ⁷ /Chp ¹⁹
GSTF9	At2g30860		Cyt ⁷ /Chp ¹⁹ /Vac ⁴
GSTF10	At2g30870		Cyt ⁹ /Chp ¹⁹ /Vac ⁴ /CW ¹
GSTF11	At3g03190		Cyt ^{*,18}
GSTF12	At5g17220		Cyt ⁷
GSTF13	At3g62760		Cyt ^{*,18}
GSTF14	At1g49860		Cyt ^{*,18}
GSTU1	At2g29490		Cyt ^{*,18}
GSTU2	At2g29480		Cyt ⁷
GSTU3	At2g29470		Cyt ^{*,18}
GSTU4	At2g29460		Cyt ^{*,18}
GSTU5	At2g29450		Cyt ⁹ /PM ¹²
GSTU6	At2g29440		Cyt ⁹
GSTU7	At2g29420		Cyt ⁷
GSTU8	At3g09270		Cyt ^{*,18}
GSTU9	At5g62480		Cyt ⁷
GSTU10	At1g74590		Cyt ^{*,18}
GSTU11	At1g69930		Cyt ⁷
GSTU12	At1g69920		Nuc ⁷
GSTU13	At1g27130		Cyt ¹⁸
GSTU14	At1g27140		Cyt ^{*,18}

GSTU15	At1g59670	Cyt ^{*,18}
GSTU16	At1g59700	Cyt ^{*,18}
GSTU17	At1g10370	Cyt ^{*,18} /Chp ¹⁹
GSTU18	At1g10360	Cyt ^{*,18}
GSTU19	At1g78380	Cyt ⁷ /Chp ^{13,19} / PM ¹² /Vac ¹⁰
GSTU20	At1g78370	Cyt ^{*,5,18} /Chp ¹⁹ /Nuc ⁵ /apoplast ³
GSTU21	At1g78360	Cyt ¹⁸
GSTU22	At1g78340	Cyt ¹⁸ /Nuc [*]
GSTU23	At1g78320	Cyt ¹⁸
GSTU24	At1g17170	Cyt ¹⁸
GSTU25	At1g17180	Cyt ¹⁸
GSTU26	At1g17190	Cyt ¹⁸
GSTU27	At3g43800	Cyt ¹⁸
GSTU28	At1g53680	Cyt ⁷
GSTL1	At5g02780	Cyt ⁷
GSTL2	At3g55040	Chp ⁶ /Cyt ⁷ /Per ^{7,19}
GSTL3	At5g02790	Cyt ⁷
GSTT1	At5g41210	Per ⁷
GSTT2	At5g41240	Per ⁷
GSTT3	At5g41220	Per ⁷
GSTT3L (with Myb-like extension)	At5g41220	Nuc ⁷

GSNO reductase

GSNO

GSNOR	At5g43940	Cyt ⁹

Glutathione peroxidase¹⁵

ROOH, H₂O₂

GPX1	At2g25080	Chp ^{**}
GPX2	At2g31570	Cyt ^{**}
GPX3	At2g43350	Mit ^{**}
GPX4	At2g48150	Cyt ^{**}
GPX5	At3g63080	ER, Cyt ^{**}
GPX6	At4g11600	Chp ^{**}
GPX7	At4g31870	Chp, Per ^{**}
GPX8	At1g63460	Cyt ^{**}

The table summarizes subcellular localization. Data was compiled on the basis of available literature, referenced below.

¹Bayer, E.M., Bottrill, A.R., Walshaw, J., Vigouroux, M., Naldrett, M.J., Thomas, C.L., and Maule, A.J. (2005). Arabidopsis cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics*, 6, 301-311.

²Benschop, J.J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A.J., Slijper, M., Menke, F.L. (2007) . Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Mol Cell Proteomics*. 6,1198-1214.

³Bindschedler, L.V., Palmblad, M., Cramer, R. (2008) Hydroponic isotope labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics; an oxidative stress case study. *Phytochemistry*. 69,1962-1972.

⁴Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T., and Raikhel, N.V. (2004). The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* 16: 3285-3303.

⁵Chen, I.C., Huang, I.C., Liu, M.J., Wang, Z.G., Chung, S.S., Hsieh, H.L. (2007) .Glutathione S-transferase interacting with far-red insensitive 219 is involved in phytochrome A-mediated signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 143:1189-1202

- ⁶Dixon, D.P., Davis, B.G., Edwards, R. (2002). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants: identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277, 30859–30869.
- ⁷Dixon, D.P., Hawkins, T., Hussey, P.J., and Edwards, R. (2009). Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *J. Exp. Bot.* 60, 1207–1218.
- ⁸Heazlewood, J.L., Tonti-Filippini, J.S., Gout, A.M., Day, D.A., Whelan, J., Millar, A.H. (2004). Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16, 241–256.
- ⁹Ito, J., Batth, T.S., Petzold, C.J., Redding-Johanson, A.M., Mukhopadhyay, A., Verboom, R., Meyer, E.H., Millar, A.H., Heazlewood, J.L. (2011). Analysis of the *Arabidopsis* cytosolic proteome, highlights subcellular partitioning of central plant metabolism. *J Proteome Res.* 10, 1571–1582.
- ¹⁰Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V., Bruley, C., Garin, J., Bourguignon, J. (2007) A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol Cell Proteomics.* 6, 394–412.
- ¹¹Koroleva, O. A., Tomlinson, M. L., Leader, D., Shaw, P., and Doonan, J. H. (2005). High-throughput protein localization in *Arabidopsis* using *Agrobacterium*-mediated transient expression of GFP-ORF fusions. *Plant J.* 41, 162–174.
- ¹²Marmagne, A., Ferro, M., Meinel, T., Bruley, C., Kuhn, L., Garin, J., Barbier-Brygoo, H. and Ephritikhine, G. (2007) A high content in lipid- modified peripheral proteins and integral receptor kinases features in the *Arabidopsis* plasma membrane proteome. *Mol. Cell Proteomics* , 6 , 1980– 1996.
- ¹³Peltier, J.B., Cai, Y., Sun, Q., Zabrouskov, V., Giacomelli, L., Rudella, A., Ytterberg, A.J., Rutschow, H., and van Wijk, K.J. (2006). The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Mol. Cell Proteomics.* 5, 114–133.
- ¹⁴Reumann, S., Quan, S., Aung, K., Yang, P., Manandhar-Shrestha, K., Holbrook, D., Linka, N., Switzenberg, R., Wilkerson, C.G., Weber, A.P., Olsen, L.J., Hu, J. (2009). In- depth proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. *Plant Physiol.* 150, 125–143.
- ¹⁵Rouhier, N., Jacquot, J.P. (2005). The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1413–1421.
- ¹⁶Smith, A.P., Nourizadeh, S.D., Peer, W.A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A.S., and Goldsbrough, P.B. (2003). *Arabidopsis* AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant J.* 36, 433–442.
- ¹⁷Tripathi, B.N., Bhatt, I., and Dietz, K.J. (2009). Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma* 235, 3–15.
- ¹⁸Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., Mauch, F. (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol Biol.* 49, 515–532.
- ¹⁹Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., van Wijk, K.J. (2008). Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* 3, e1994 1–19.

*AtSubP analysis from TAIR (2012-08-23)

**Localizations of Gpxs are essentially based on prediction programs (Psort (<http://www.psort.nibb.ac.jp/form.html>), TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)).

Supplemental Table 2. Summary details of studies from which the expression data shown in Figure 4 were obtained. All data were extracted from www.genevestigator.com (Hruz et al., 2008). Where data were deposited in relation to a specific original publication, these are indicated.

Reference	Treatment
Davletova et al., 2005	hydrogen peroxide: Col-0 seedlings (5-day-old) were treated with 20 mM H ₂ O ₂ for 1 hour. The controls were not treated.
www.genevestigator.com	ozone: Col-0 seedlings (cotyledons fully opened) were treated with 500ppb ozone for 6 hours. The controls were air-treated
www.genevestigator.com	paraquat: Col-0 plants were grown for 2 weeks (16h light (120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 8h dark cycles, 23°C, 65–70% relative humidity) and then removed from soil and floated with adaxial surfaces facing the light source in 50 μM MV, 0.01 % (v/v) Tween 20 solution for 2h at 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ illumination, 23°C. After MV treatment aerial parts were separated from roots. The controls were treated with 0.01 % (v/v) Tween 20 solution for 2h.
Laloi et al., 2007	<i>flu</i> mutant: Col-0 and the <i>flu</i> mutant were grown in long days for 3 weeks and harvested after and re-illuminated for 120 min following the dark period.
Mhamdi et al., 2010	<i>gr1</i> , <i>cat2</i> and <i>cat2 gr1</i> mutants: plants were grown for 21 days at high CO ₂ (8h light /16h dark regime) and then transferred to air for 4 days.
Queval et al., 2012	<i>cat2</i> mutants: plants were grown for 5 weeks at high CO ₂ (8h light /16h dark regime) and then transferred to air for 2 or 4 days

Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., and Mittler, R. (2005). The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139, 847-856.

Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., and Zimmermann, P. (2008). Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* 420747

Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I., and Apel, K. (2007). Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 672-677.

Mhamdi, A., Hager, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Taconnat, Y., Saindrenan, P., Issakidis-Bourguet, E., Gouia, H., Renou, J.P., and Noctor, G. (2010). *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE 1 is essential for the metabolism of intracellular H₂O₂ and to enable appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol.* 153,1144-1160

Queval, G., Neukermans, J., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., and Noctor, G. (2012). Day length is a key regulator of transcriptomic responses to both CO₂ and H₂O₂ in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 35, 374-387.

II.1.2. Discussion et Transition 1

S'il commence à être bien établi que le statut intracellulaire du glutathion impacte sur la signalisation redox via la régulation de l'état thiol-disulfure des protéines, les enzymes qui oxydent le glutathion susceptibles de modifier ce statut restent à élucider. Dans cette étude, nous avons cherché à les identifier.

Il est ressorti de ce travail que de nombreuses voies peuvent oxyder le GSH à savoir les glutathion peroxydases, les glutathion-S-transférases, les peroxirédoxines de type II-glutarédoxine dépendantes, la S-nitrosothiol réductase, ou encore la voie ascorbate-glutathion (**Article 1**, Fig. 1). Chacune de ces voies a été évaluée pour ses capacités à oxyder le glutathion soit d'un point de vue qualitatif : biochimique (**Article 1**, tableaux 2,3 et 4), soit quantitatif : transcriptomique (**Article 1**, Fig. 4) ou encore fonctionnel : génétique.

Compte tenu de la multiplicité des candidats potentiels, les données disponibles dans la littérature sont souvent incomplètes. Par exemple, sur la cinquantaine d'isoformes de GSTs présente chez *Arabidopsis*, les données biochimiques, transcriptomiques et génétiques ne sont que partielles. De plus, la possibilité de redondance physiologique est évidente, non seulement entre les différentes isoformes mais aussi entre les différentes classes d'enzymes. Les études génétiques détaillées par perte de fonction sont encore rares, les premières font apparaître qu'une redondance/inter-dépendance élevée existe entre les classes d'enzymes, aussi bien dans le métabolisme du H_2O_2 que dans l'oxydation du GSH.

Cependant, objectivement, nos analyses ont révélé des candidats susceptibles d'être plus importants que d'autres dans l'oxydation du GSH. Ces candidats seraient la DHAR2, la GSTU8, la GSTU24 et la GSTU25. Le fait marquant et intéressant de ces résultats est que toutes ces enzymes candidates sont cytosoliques, même si le site initial de la production de H_2O_2 est dans un autre compartiment cellulaire. Ce résultat n'est pas, pour autant, surprenant, si on tient compte des voies de transport du H_2O_2 intracellulaires (**Partie I**, Fig. 9).

Nos résultats mettent en avant l'importance des voies cytosoliques dans la détermination du statut du glutathion cellulaire, elles permettent, potentiellement, de coupler le stress oxydant à l'activation de la signalisation redox en aval. Des études menées antérieurement dans notre équipe soutiennent également cette idée (Mhamdi et al., 2010a et 2010b).

Notre analyse souligne bien le fait que de nombreux points restent encore à élucider sur la question d'oxydation du glutathion. De nouveaux éléments de précisions vont être apportés dans les Sous-parties qui suivent. En effet, nous avons entrepris l'analyse fonctionnelle des différents candidats qui ont émergé de notre étude. Nous verrons que la confirmation de l'implication des enzymes candidates dans l'oxydation du glutathion nous a permis d'avoir, non seulement, une meilleure compréhension de la régulation redox liée au stress oxydant, mais aussi, nous a amenés à étendre notre analyse à d'autres voies de signalisations, pour intégrer, par exemple, celles liées aux phytohormones.

II. Résultats

II.2. Rôles des différentes isoformes de DHAR dans l'oxydation du glutathion impactant la voie de signalisation liée à l'acide salicylique

II.2.1 Préambule 2

La voie ascorbate-glutathion prend en charge le H_2O_2 via l'APX qui utilise l'ASC comme réducteur, puis la MDHAR-NAD(P)H dépendante ou la DHAR assurent la régénération de l'ASC (**Article 1**, Fig. 1). Ce sont les DHARs qui conduisent à l'oxydation du GSH en régénérant l'ASC. Enfin, la GR-NADPH dépendante intervient pour régénérer le GSH. Cette voie est-elle impliquée dans l'accumulation du GSSG observé alors d'un stress oxydant?

Chez *Arabidopsis*, les DHARs sont codées par trois gènes appartenant à la superfamille des glutathion S-transférases et, *in vitro*, les trois protéines ont montré une activité DHAR (Dixon et al., 2002 ; Dixon et Edwards, 2010). Même si l'étude précédente désigne l'isoforme cytosolique DHAR2 comme candidat favori, j'ai quand même étudié les trois isoformes car peu d'information existait sur l'importance relative de chacune d'entre elles.

Dans cette étude, nos objectifs ont été (1) de déterminer les réactions directement responsables de l'oxydation du glutathion pendant un stress oxydant ; (2) de comprendre le couplage de l'ascorbate et du glutathion en conditions optimales de croissance mais aussi en situation de stress oxydant ; (3) et enfin de déterminer l'importance de chacun des gènes de DHAR chez *Arabidopsis*.

Une gamme complète de mutantes pertes de fonction simples, doubles et triple pour les trois DHARs d'*Arabidopsis* était déjà disponible dans l'équipe à mon arrivée au laboratoire. De plus, toutes les combinaisons mutantes ont été introduites dans le mutant *cat2* déficient en catalase pour produire des lignées mutantes doubles, triples et quadruple. Cette approche a été choisie parce que: (1) le mutant *cat2* est un fond génétique stable de stress oxydant ; (2) il offre la possibilité d'induire une perturbation redox reproductible liée à une production de H_2O_2 endogène via la photorespiration ; (3) une diminution de l'activité de la catalase force le métabolisme de H_2O_2 par des systèmes alternatifs qui dépendent des réducteurs cellulaires tel que le glutathion ; (4) et la sur-disponibilité en H_2O_2 chez *cat2* mime un tronc de signalisation commun en réponse à de nombreux stress (vue dans la **Partie I**, Figs 8, 9 et 16 ; Queval et al., 2009 ; Chaouch et al., 2010 ; Mhamdi et al., 2010a ; Kaurilind et al., 2015). Cependant, faute de lignées alléliques pour nos mutants DHAR, j'ai entrepris la construction de lignées complémentaires en ré-introduisant chacune des isoformes de la DHAR dans le fond triple mutant *dhar1 dhar2 dhar3* ou quadruple mutant *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*. En outre, la localisation subcellulaire des DHARs n'étant pas clairement établie, ces lignées apportent de nouveaux éléments de connaissance sur ce point, puisque mes constructions correspondent à des versions fusionnées de DHAR avec la GFP.

ARTICLE 2

Cytosolic and chloroplastic DHARs cooperate in oxidative stress-driven activation of the salicylic acid pathway.

Rahantaniaina MS, Li S, Chatel-Innocenti G, Tuzet A, Issakidis-Bourguet E, Mhamdi A, Noctor G

Plant Physiol (2017) 174: 956–971.

Cytosolic and Chloroplastic DHARs Cooperate in Oxidative Stress-Driven Activation of the Salicylic Acid Pathway^{1[OPEN]}

Marie-Sylviane Rahantaniaina², Shengchun Li^{2,3}, Gilles Chatel-Innocenti, Andrée Tuzet, Emmanuelle Issakidis-Bourguet, Amna Mhamdi⁴, and Graham Noctor*

Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, Unité Mixte de Recherche 9213/Unité Mixte de Recherche 1403, Université Paris-Sud, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique, Université d'Evry, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, 91405 Orsay, France (M.-S.R., S.L., G.C.-I., E.I.-B., A.M., G.N.); and Unité Mixte de Recherche ECOSYS/Pôle BIOCLIMATOLOGIE, Institut National de la Recherche Agronomique-AgroParisTech, F-78850 Thiverval-Grignon, France (A.T.)

ORCID IDs: 0000-0002-1758-866X (M.-S.R.); 0000-0003-3617-4195 (A.T.); 0000-0001-9959-1362 (A.M.); 0000-0003-1980-4554 (G.N.).

The complexity of plant antioxidative systems gives rise to many unresolved questions. One relates to the functional importance of dehydroascorbate reductases (DHARs) in interactions between ascorbate and glutathione. To investigate this issue, we produced a complete set of loss-of-function mutants for the three annotated *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) DHARs. The combined loss of *DHAR1* and *DHAR3* expression decreased extractable activity to very low levels but had little effect on phenotype or ascorbate and glutathione pools in standard conditions. An analysis of the subcellular localization of the DHARs in *Arabidopsis* lines stably transformed with GFP fusion proteins revealed that *DHAR1* and *DHAR2* are cytosolic while *DHAR3* is chloroplastic, with no evidence for peroxisomal or mitochondrial localizations. When the mutations were introduced into an oxidative stress genetic background (*cat2*), the *dhar1 dhar2* combination decreased glutathione oxidation and inhibited *cat2*-triggered induction of the salicylic acid pathway. These effects were reversed in *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* complemented with any of the three DHARs. The data suggest that (1) DHAR can be decreased to negligible levels without marked effects on ascorbate pools, (2) the cytosolic isoforms are particularly important in coupling intracellular hydrogen peroxide metabolism to glutathione oxidation, and (3) DHAR-dependent glutathione oxidation influences redox-driven salicylic acid accumulation.

¹ This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (grant Cynthiol to G.N.), by the Doctoral School ED129 Sciences de l'Environnement d'Ile de France (Bourse Ministérielle Ph.D. studentship to M.-S.R.), and by Michel Dron (Institute of Plant Sciences Paris-Saclay) and the Université de Paris Sud (funding toward Ph.D. studies for S.L.).

² These authors contributed equally to the article.

³ Present address: Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, College of Life Science, Hubei University, 430062 Wuhan, China.

⁴ Present address: Department of Plant Systems Biology, VIB, and Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, 9052 Ghent, Belgium.

⁵ While GSH is often used as an abbreviation for (total) glutathione, here GSH is used specifically to denote the reduced (thiol) form. Where the meaning is intended to encompass both GSH and glutathione disulfide (GSSG), "glutathione" is used.

* Address correspondence to graham.noctor@u-psud.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Graham Noctor (graham.noctor@u-psud.fr).

M.-S.R. and S.L. performed most of the experimental work; G.C.-I., A.T., E.I.-B., and A.M. were involved in designing and providing assistance for some of the experiments; M.-S.R. and G.N. analyzed the data and produced the figures; G.N. conceived the original research project and experimental approaches and with M.-S.R. wrote the manuscript.

[OPEN] Articles can be viewed without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.17.00317

Recent years have witnessed an ever-growing focus on the roles of reactive oxygen species (ROS) in plants, with molecules such as hydrogen peroxide (H₂O₂) implicated in numerous developmental processes and environmental responses (Dietz et al., 2016). Key questions remain concerning exactly how the signaling functions of these reactive species are mediated (Foyer and Noctor, 2016). When produced inside the cell, the accumulation of ROS is limited by their reactivity with multiple antioxidant systems found in plants. In the aqueous phase, such systems include catalases, ascorbate, glutathione, and peroxiredoxins (Rouhier et al., 2002; Tripathi et al., 2009; Mhamdi et al., 2010b; Foyer and Noctor, 2011; Smirnoff, 2011; Awad et al., 2015). At least some of the signaling effects of ROS may involve secondary changes in such antioxidative systems (Han et al., 2013a).

Ascorbate and glutathione often are considered to work together in ROS removal. Following oxidation, ascorbate can be regenerated through several reactions, only one of which, reduction of dehydroascorbate (DHA), is known to be strongly dependent on glutathione (Foyer and Noctor, 2011; Smirnoff, 2011). When the ascorbate-glutathione pathway was originally formalized as a chloroplast route for ROS processing, DHA reduction was proposed to be nonenzymatic

(Foyer and Halliwell, 1976). Although the chemical reaction between reduced (thiol) glutathione (GSH)⁵ and DHA is rapid, proteins that catalyzed GSH-dependent ascorbate formation from DHA have been partially purified and characterized from several plants, including spinach (*Spinacia oleracea*), rice (*Oryza sativa*), and poplar (*Populus* spp.; Foyer and Halliwell, 1977; Hossain and Asada 1984; Kato et al., 1997; Shimaoka et al., 2000; Lallement et al., 2016). A recent survey of taxonomically diverse species suggests that plants contain between two and four genes encoding dehydroascorbate reductase (DHAR; Zhang et al., 2015). In Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), three genes that belong to the glutathione S-transferase (GST) superfamily were annotated to encode DHARs, and all three proteins were shown to have DHAR activity in vitro (Dixon et al., 2002; Dixon and Edwards, 2010).

Studies using tobacco (*Nicotiana tabacum*) lines overexpressing or underexpressing DHAR revealed roles for the enzyme in determining stomatal opening, plant performance, and ascorbate contents (Chen et al., 2003; Chen and Gallie, 2004, 2006). Other studies have reported positive effects of overexpressing various DHARs (Kwon et al., 2001, 2003; Wang et al., 2010; Yin et al., 2010; Le Martret et al., 2011; Chang et al., 2017). Nevertheless, because plants contain various proteins able to catalyze GSH-dependent DHA reduction and because the reaction can occur nonenzymatically at quite high rates, questions remain surrounding the exact significance of DHARs. Indeed, kinetic modeling of the chloroplast ascorbate-glutathione pathway suggested that the chemical reaction could be largely predominant (Polle, 2001). For these reasons, the physiological importance of DHARs in oxidative stress has been subject to some debate (Morell et al., 1997; Foyer and Mullineaux, 1998; Smirnoff, 2011), and the biological roles of the endogenous genes, and the relationships between them, remain to be elucidated.

While DHA reduction is considered to be important to regenerate ascorbate, and therefore to prevent its irreversible breakdown (Parsons and Fry, 2012), proteins that can oxidize GSH may be important in regulating redox signaling pathways (Han et al., 2013a, 2013b). Glutathione accumulation, largely in the form of GSSG, has long been known to occur in response to increased intracellular H₂O₂ (Smith et al., 1984; May and Leaver, 1993), but the extent to which such effects are DHA dependent is not known (Rahantaniaina et al., 2013). Other systems, such as GSTs or glutaredoxin-peroxiredoxins, may couple ROS removal to GSH oxidation (Rouhier et al., 2002; Dixon et al., 2009; Tripathi et al., 2009). Although the ascorbate-glutathione pathway has become accepted as an important route for ROS metabolism in plants, the extent to which the two antioxidants interact in vivo remains to be established (Noctor et al., 2000; Foyer and Noctor, 2011).

In Arabidopsis, three genes are annotated to encode DHAR (Dixon et al., 2002). While the encoded proteins may allow DHAR activity in both the chloroplast and the cytosol, some studies point to DHAR1 localization

in the peroxisomes (Dixon et al., 2002; Reumann et al., 2009; Grefen et al., 2010; Tang and Yang, 2013). To date, three studies have appeared using single loss-of-function mutants. The earliest reported a substantial effect on the extractable activity (about 30% of the wild-type value) and effects on ozone resistance in *dhar2* (Yoshida et al., 2006). Very recently, a much smaller decrease was reported in a line lacking *DHAR2* function, with most of the activity associated with *DHAR1*. Single mutants for both genes were reported to show modified ascorbate and glutathione redox states following photooxidative stress (Noshi et al., 2017). A similar study of *DHAR3* also reported decreased activity and altered responses to photooxidative stress (Noshi et al., 2016).

In this work, we aimed to investigate the following distinct but related questions. What are the reactions that are directly responsible for glutathione oxidation during oxidative stress? To what extent are ascorbate and glutathione redox coupled in optimal and oxidative stress conditions? How important are the different genes encoding Arabidopsis DHAR? To answer these questions, we generated a complete set of single, double, and triple loss-of-function mutants for the three Arabidopsis DHARs and analyzed the localization of the three proteins in parallel. We also introduced all mutant combinations into a catalase-deficient background (*cat2*) to produce double, triple, and quadruple mutant lines. This approach was chosen because decreased catalase activity forces H₂O₂ metabolism through alternative systems that are dependent on cellular reductants (Mhamdi et al., 2010b). Our analysis of the *dhar* mutant lines, grown in parallel in identical conditions, shows that DHAR activity can be decreased to negligible levels without marked effects on plant growth or the ascorbate pool. However, the three DHARs have partly redundant roles in ensuring glutathione oxidation when H₂O₂ metabolism is enhanced, and their combined absence in these conditions impacts plant phenotypes and pathogenesis-related signaling.

RESULTS

To analyze the roles of the three *DHAR* genes, we obtained Arabidopsis T-DNA mutants with insertions in the corresponding coding sequences. Homozygous lines were readily obtained for *dhar* mutations, and reverse transcription-PCR confirmed that they were all knockouts or severe knockdowns (Supplemental Fig. S1, left). Loss of *DHAR1* or *DHAR3* function decreased extractable leaf activity by about 50%, while the effect of the *dhar2* mutation was much less marked (Fig. 1A). From these lines, three double mutants were produced. The *dhar1 dhar2* double mutant showed similar activity to *dhar1*, while the *dhar1 dhar3* combination decreased DHAR activity to 5% of the wild-type level (Fig. 1A). Combining the *dhar2* and *dhar3* mutations led to an increase in DHAR activity compared with the *dhar3* single mutant, pointing to a compensatory effect that

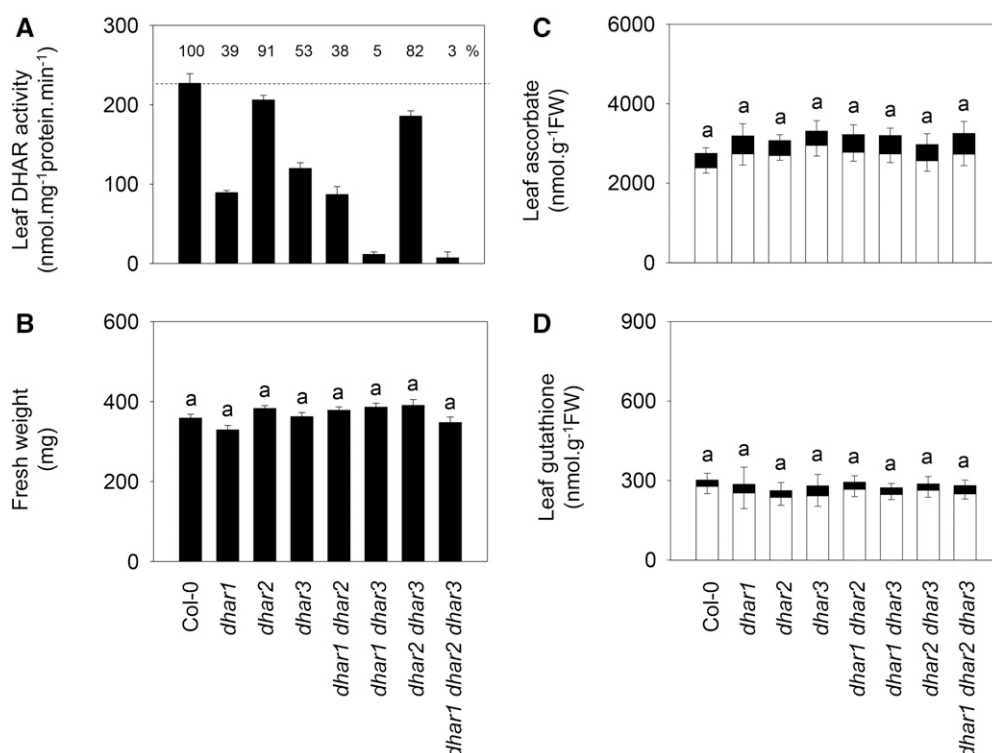


Figure 1. Functional characterization of single, double, and triple *dhar* mutants. A, Extractable DHAR activity in leaf extracts. Plants were grown 3 weeks under 16 h of light/8 h of dark at an irradiance of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 65% relative humidity. Percentage DHAR activity relative to Columbia-0 (Col-0; dotted line) is indicated at the top of the frame. Data are means $\pm$ SE of six different extracts. B, Fresh weight (FW) of Col-0 and mutants. Plants were sampled in the same conditions as in A. Values are means $\pm$ SE of 15 plants. C and D, Leaf contents of ascorbate (C) and glutathione (D) in Col-0 and *dhar* mutants. White bars, Reduced forms; black bars, oxidized forms. Values are means $\pm$ SE of three plants, sampled in the same conditions as in A and B. The same letter indicates no significant difference by Student's *t* test at $P < 0.05$ (for total leaf pools in C and D; redox states are shown in Supplemental Table S1).

was presumably linked to *DHAR1*, because a triple mutant, in which all three genes were mutated, showed negligible activity (Fig. 1A).

Functional Impact of *dhar* Mutations in Optimal and Oxidative Stress Conditions

When grown in standard conditions, none of the single, double, or triple mutants showed any difference in phenotype compared with Col-0 (Fig. 1B; Supplemental Fig. S2). Similarly, leaf ascorbate and glutathione pools remained at wild-type levels and reduction states (Fig. 1, C and D; Supplemental Table S1).

As a first test of the role of each DHAR in stress responses, mutants were grown in vitro in agar containing stressful concentrations of cadmium, mannitol, salt, or paraquat, and root growth was measured (Supplemental Fig. S3). Loss of DHAR function caused a slight increase in cadmium sensitivity, which was more evident at low concentrations and which was apparent even in the three single mutants. Growth on mannitol was not substantially affected by the mutations, but *dhar1 dhar2*, *dhar1 dhar3*, and the triple mutant showed somewhat enhanced sensitivity to NaCl (Supplemental Fig. S3).

All three single mutations enhanced sensitivity to the oxidative stress caused by paraquat, although combination of the mutations did not reinforce this effect (Supplemental Fig. S3).

Taken together, the above results suggest that none of the three DHARs is required for plant development but that they may interact in a complex manner to determine stress resistance. To explore this point further, the three mutations were introduced into a catalase-deficient background in which enhanced intracellular H_2O_2 availability increases the demand on reductants such as ascorbate and glutathione (Mhamdi et al., 2010b). Thus, we produced double *cat2 dhar1*, *cat2 dhar2*, and *cat2 dhar3* mutants, and from these lines, we produced three triple and one quadruple mutant (Supplemental Fig. S1, right). Analysis of extractable leaf DHAR in *cat2* revealed that the activity was increased in response to the oxidative stress caused by catalase deficiency (Fig. 2A, top). Analysis of double *cat2 dhar* mutants suggested that DHAR1 was responsible for most of the DHAR activity in the *cat2* background and that the remainder was largely due to DHAR3. Activities in *cat2* and *cat2 dhar2* were similar (Fig. 2A, top), suggesting that, as in the Col-0 background, DHAR2 makes a minor contribution to the

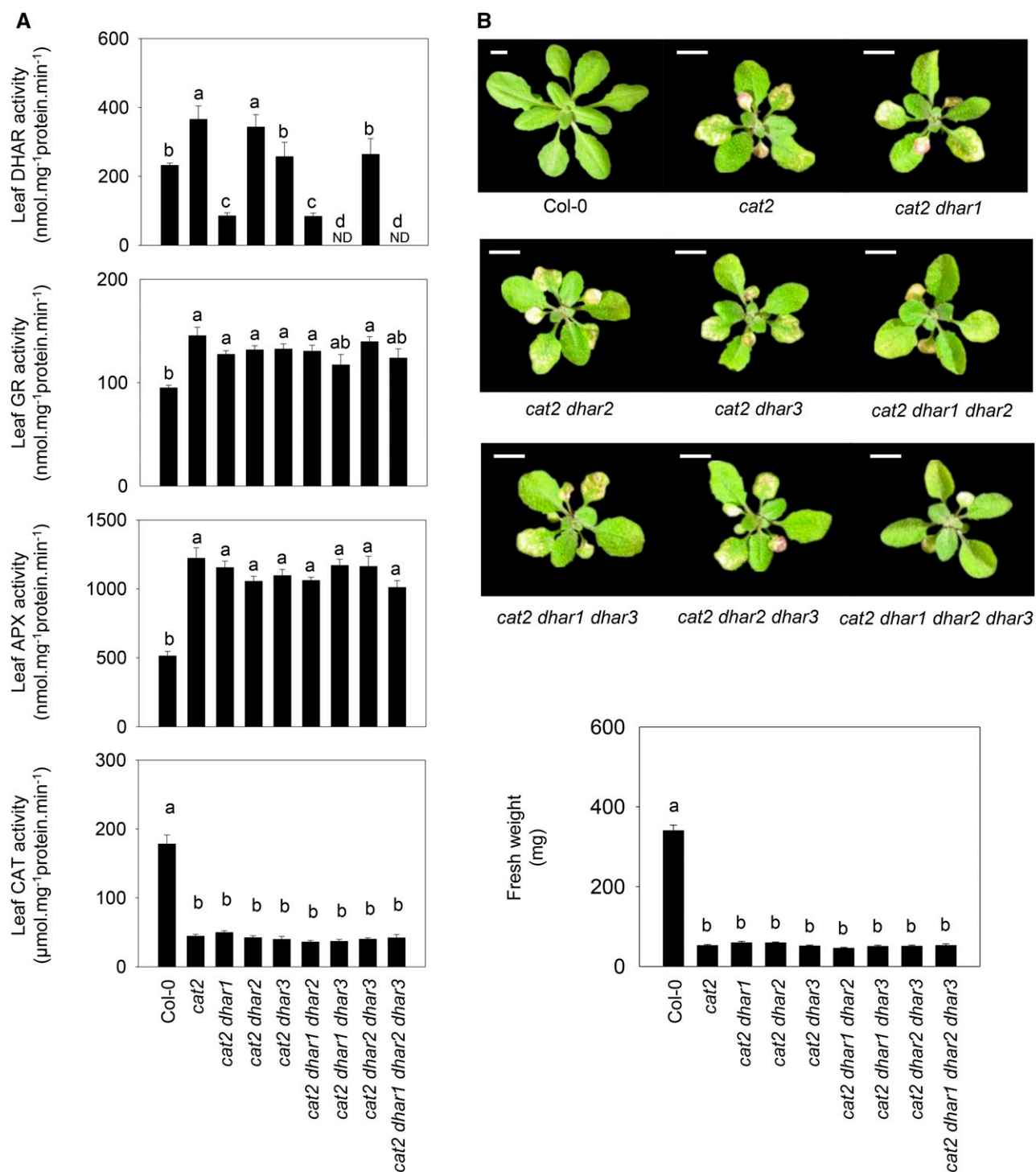


Figure 2. Major antioxidative enzyme activities (A) and phenotypes (B) in the *cat2* mutant carrying T-DNA insertions in *DHAR1*, *DHAR2*, and *DHAR3* singly or in combination. A, Extractable leaf activities of DHAR, GR, APX, and CAT after 3 weeks of growth at an irradiance of $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in a 16-h photoperiod. Data are means $\pm$ SE of nine biological replicates for DHAR leaf activity and six for other enzymes. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$. ND, Not detected. B, Photographs of mutants and rosette fresh weight, determined in the same conditions as in A. For fresh weight, values are means $\pm$ SE of 15 to 24 plants. Bars = 1 cm.

extractable leaf activity. Consistent with this, no activity was detected in *cat2 dhar1 dhar3* or the quadruple *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* mutant (Fig. 2A, top).

As reported previously, the *cat2* mutant showed only about 20% of wild-type leaf catalase activity (Queval et al., 2009), and this was not affected by any of the

combinations of *dhar* mutations (Fig. 2A, bottom). The activities of two other enzymes of the ascorbate-glutathione pathway, glutathione reductase (GR) and ascorbate peroxidase (APX), were increased alongside DHAR in *cat2*, but the presence of the *dhar* mutations had little effect on either (Fig. 2A, middle). The *dhar* mutations did not affect rosette mass in the *cat2* background (Fig. 2B, bottom), but two mutant combinations significantly impacted the *cat2*-triggered phenotype (Fig. 2B, top). While *cat2* and most of the derived *cat2 dhar* lines showed clearly visible hypersensitive response-like lesions on specific leaves, these were much less apparent in *cat2 dhar1 dhar2* and *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* (Fig. 2B, top).

Genetically or pharmacologically induced catalase deficiency causes the accumulation of glutathione (Smith et al., 1984; May and Leaver, 1993; Willekens et al., 1997; Mhamdi et al., 2010b; Queval et al., 2011). Accordingly, leaf glutathione was about 2-fold higher in *cat2* than in Col-0, with the difference being almost entirely due to GSSG (Fig. 3, bottom). As a result, the glutathione reduction state, which was above 90% in Col-0, was only 64% in *cat2* (Supplemental Table S2). Glutathione was significantly less oxidized in the triple *cat2 dhar1 dhar2* and quadruple *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* mutants (Supplemental Table S2), and this was accompanied by decreased total glutathione in these two lines (Fig. 3, bottom). All other *cat2 dhar* lines showed similar glutathione status to *cat2*. As reported previously, ascorbate is less affected in *cat2* than is glutathione (Mhamdi et al., 2010a, 2010b; Han et al., 2013a). No difference in total ascorbate contents was observed in any of the mutants relative to Col-0 (Fig. 3, top). However, several lines in the *cat2* background showed a slightly but significantly more oxidized ascorbate pool as a result of the presence of additional mutations in *dhar* (Supplemental Table S2).

Subcellular Localization of the Three DHARs

Fusion proteins were constructed for all three DHARs with the GFP tag fused C or N terminally (DHAR-GFP or GFP-DHAR, respectively). The six constructs were transformed into the quadruple *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* and the triple *dhar1 dhar2 dhar3* mutant backgrounds, and T1 plants were analyzed. Despite repeated attempts, we were not able to regenerate plants expressing GFP-DHAR1 in either the *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* or *dhar1 dhar2 dhar3* background. DHAR1-GFP showed a cytosolic localization in the leaves of the quadruple mutant background (Fig. 4). A similar localization also was observed for DHAR1-GFP in the roots of this line (Supplemental Fig. S4) and in the leaf cells of the *dhar1 dhar2 dhar3* triple mutant background (Supplemental Fig. S5). Fluorescence patterning did not overlap with the positive control for peroxisomal localization (Supplemental Fig. S6).

DHAR2-GFP and GFP-DHAR2 fusions showed similar fluorescence patterns to the negative GFP

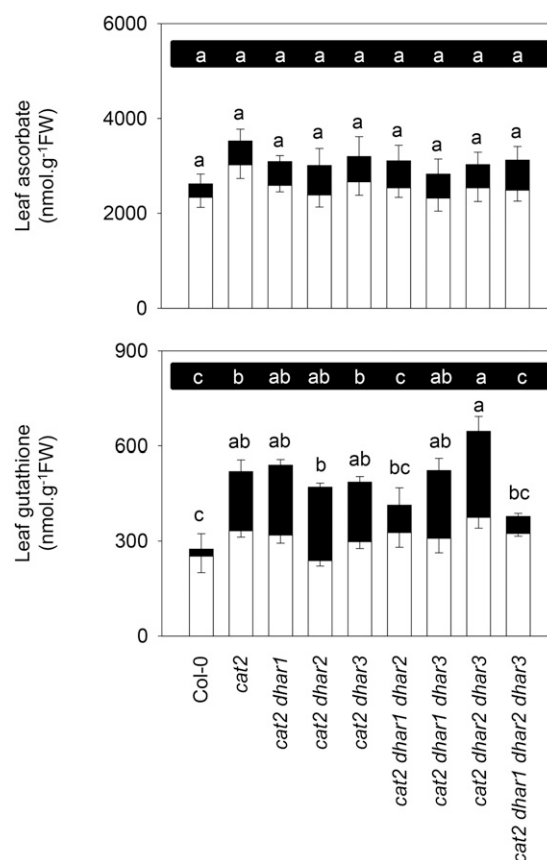


Figure 3. Effects of *dhar* mutations on oxidative stress-triggered changes in ascorbate and glutathione. White bars, Reduced forms; black bars, oxidized forms; FW, fresh weight. Values are means $\pm$ SE of three plants, sampled at 3 weeks at an irradiance of $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in a 16-h photoperiod. Different letters indicate significant differences in oxidized forms (top row of letters on black background) or total contents (bottom row of letters) at $P < 0.05$ by one-way ANOVA with posthoc Tukey's honestly significant difference, a test calculator for comparing multiple treatments.

control, confirming a cytosolic localization in the leaves of both genetic backgrounds (Fig. 4; Supplemental Fig. S5). Both DHAR2 fusions also gave a cytosolic signal in the roots (data not shown). In contrast to DHAR1 and DHAR2, DHAR3-GFP was associated with the chloroplast. The DHAR3-GFP signal showed close overlap with chlorophyll autofluorescence in the leaves of both the complemented quadruple and triple mutants (Fig. 4; Supplemental Fig. S5). To establish whether DHAR3 also might be targeted to the mitochondria, we compared GFP fluorescence with MitoTracker signals and with a positive control for dual chloroplast-mitochondrion targeting (PDF1B-GFP) in roots. MitoTracker fluorescence revealed no overlap with the DHAR3-GFP signal (Supplemental Fig. S4). Whereas PDF1B-GFP fluorescence patterns were observed in both the larger plastids and the smaller punctate mitochondria, DHAR3-GFP signals were observed only in plastids (Supplemental Fig. S4). When the GFP was

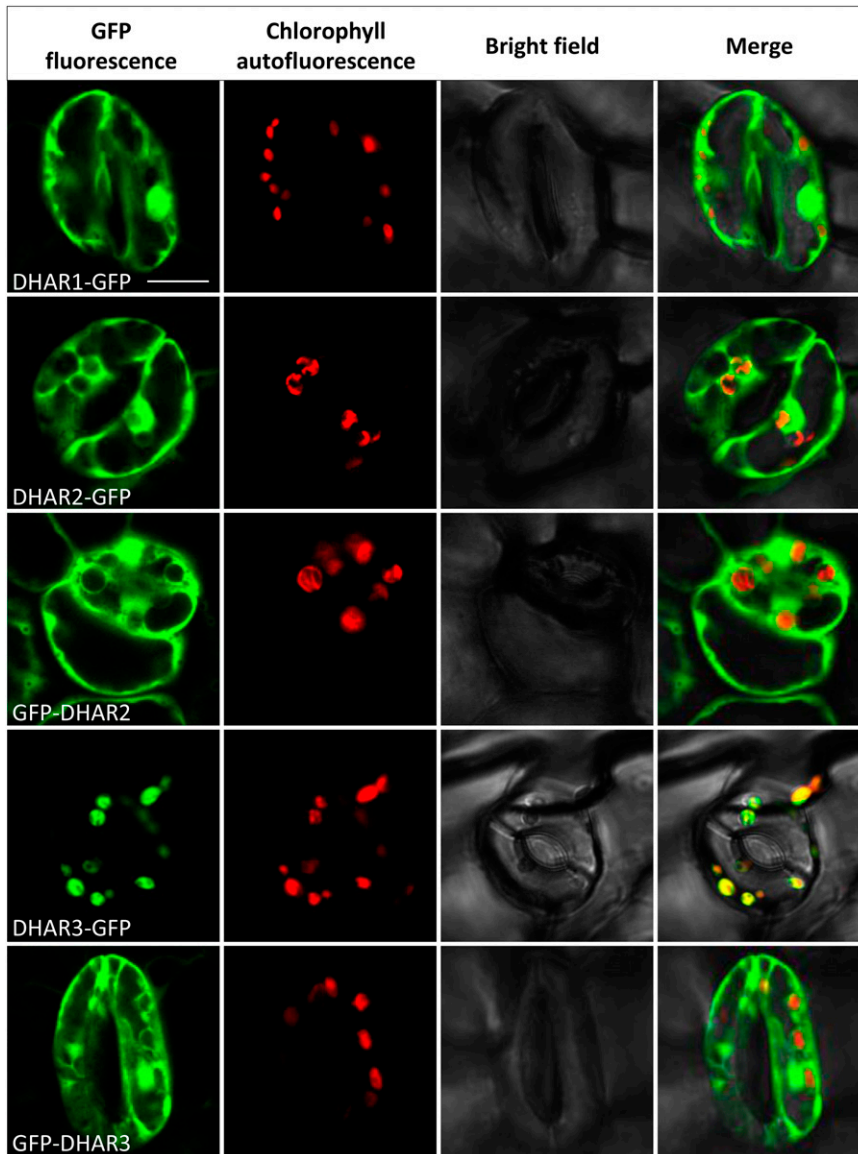


Figure 4. Subcellular localization of DHAR-GFP fusion proteins. Full-length sequences of *AtDHAR1*, *AtDHAR2*, and *AtDHAR3* were tagged with GFP in the N-terminal (GFP-DHAR) or C-terminal (DHAR-GFP) position and introduced into the *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* quadruple mutant. No transformants for GFP-DHAR1 were recovered. The images correspond to epidermal cells of 10-d-old seedlings. From left to right are GFP fluorescence (green), chlorophyll autofluorescence (red), bright-field, and merged images. Bar = 10 μ m.

fused to the DHAR3 N terminus (GFP-DHAR3), no association with the chloroplast was observed; instead, a diffuse pattern of staining appeared (Fig. 4; Supplemental Fig. S5), consistent with targeting of the native DHAR3 to the chloroplast through an N-terminal signal peptide sequence. In conclusion, these data suggest that DHAR1 and DHAR2 are cytosolic while DHAR3 is localized in plastids. This distribution was not affected by the presence of the *cat2* mutation.

Functional Complementation of the *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* Quadruple Mutant

To further evaluate the importance of the three DHARs in oxidative stress responses, we analyzed the ability of DHAR-GFP fusion proteins for each of the

three DHARs to complement extractable activity, glutathione contents, and phenotypes in T2 individuals of the *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* mutant. For each DHAR, two independent lines were obtained that showed a 3:1 segregation for antibiotic resistance in T2 (Supplemental Table S3). In resistant DHAR1-GFP and DHAR3-GFP plants, DHAR activity was restored to about 50% of the value in *cat2* (Fig. 5). No increase in extractable DHAR activity was detected in antibiotic-resistant individuals from the quadruple mutant complemented with DHAR2-GFP (Fig. 5).

Complementation of *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* plants with DHAR1 or DHAR3 caused significant increases in GSSG (Fig. 6B). As a result, the glutathione status of DHAR1-GFP+ and DHAR3-GFP+ plants was more similar to that of the single *cat2* mutant than to that of the parent quadruple mutant line (Fig. 6B). No effect on ascorbate was observed (Fig. 6A). Despite the lack of a

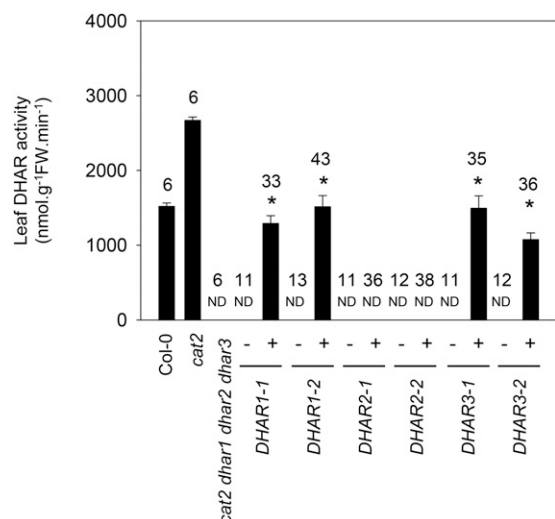


Figure 5. DHAR activities in the *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* line complemented with *DHAR1*, *DHAR2*, or *DHAR3* (two independent lines each). Enzyme activities were determined in leaf extracts from 15-d-old T2 plants. Plus or minus indicates the presence or absence of the transgene in the plants in which activity was measured. The number of plants assayed is given above the columns for each genotype. Asterisks indicate significant differences at $P < 0.05$ from the activity in the uncomplemented *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* mutant. FW, Fresh weight; ND, not detected.

detectable increase in extractable activity in *DHAR2*-GFP+ complemented lines, introduction of this protein also increased glutathione contents and decreased the glutathione reduction state (Fig. 6D). However, the effect was somewhat different from that produced by the introduction of *DHAR1* or *DHAR3*. Complementation with *DHAR2* caused glutathione to increase above *cat2* levels and to remain more reduced than in *cat2*, albeit less reduced than in the uncomplemented quadruple mutant line (Fig. 6D). Again, no effect on ascorbate was observed (Fig. 6C).

Complementation with *DHAR1*, *DHAR2*, or *DHAR3* restored the *cat2* lesion phenotype in the *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* quadruple mutant. Two experiments with different batches of T2 seed revealed a 3:1 phenotype segregation (Supplemental Table S4). In a first step to analyze this effect more closely, lesions were quantified using imaging software. Quantification in Col-0 and the eight *cat2 dhar* loss-of-function lines showed that all lines carrying the *cat2* mutation presented lesions on about 15% of the total rosette surface, except the two lines in which *DHAR1* and *DHAR2* functions were both lost (*cat2 dhar1 dhar2* and *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*; Fig. 7A). The *cat2*-dependent lesions could be fully restored by complementation of the quadruple mutant with any of the three DHARs (Fig. 7B). The role of the different DHARs in oxidative stress linked to catalase deficiency was further tested using 3-AT. Like the *cat2* mutation, catalase inhibition by this herbicide engages GSH-dependent processes, which become apparent as the accumulation of GSSG (May and Leaver, 1993). Spraying

with 3-AT caused a bleaching phenotype within 2 d in the wild type (Supplemental Fig. S7). The appearance of this phenotype was inhibited in *dhar1* and, more clearly, in *dhar1 dhar2* and *dhar1 dhar3* double mutants as well as in the triple *dhar1 dhar2 dhar3* mutant line (Fig. 7C; Supplemental Fig. S7). Similar to the effects observed in the *cat2* background (Fig. 3), 3-AT-induced accumulation of GSSG was decreased significantly in *dhar1 dhar2* and, especially, in *dhar1 dhar2 dhar3* (Fig. 7D). Consequently, glutathione remained significantly more reduced in these lines than in the wild type treated with 3-AT (Supplemental Table S5).

Roles of DHARs in Oxidative Stress-Triggered Activation of the Salicylic Acid Pathway and Cell Death

To explore the processes underlying the phenotypic effects described above, we analyzed the effects of the three *dhar* mutations on transcripts of a key gene involved in salicylic acid (SA) synthesis (*ICS1*) and two SA-dependent pathogenesis-related genes (*PR1* and *PR2*). All three genes were markedly induced in response to oxidative stress in *cat2* but less so in the quadruple *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* line (Fig. 8). In the Col-0 background, the triple loss of DHAR function also decreased basal levels of *PR1* and *PR2* transcripts, although *ICS1* transcripts were increased slightly (Fig. 8).

In a second approach, we profiled the lesion phenotype of the leaves from Col-0 and all eight lines containing *cat2* and *dhar* mutations in combination. In the *cat2* single mutant, cell death was apparent on the oldest leaves, both as whitish lesions and Trypan Blue-positive staining (Fig. 9A). Similar phenotypes to *cat2* were observed in *cat2 dhar1*, *cat2 dhar2*, *cat2 dhar3*, *cat2 dhar1 dhar3*, and *cat2 dhar2 dhar3* (Fig. 9A). By contrast, lesions were restricted to one or two of the very oldest leaves in *cat2 dhar1 dhar2* and the quadruple mutant (Fig. 9A). Hence, a clear phenotypic difference was apparent between these two lines and the others carrying the *cat2* mutation, particularly on leaves 4 and 5 (Fig. 9A). Measurements of glutathione specifically in these leaves confirmed the effect of the combined *dhar1* and *dhar2* mutations on *cat2*-triggered effects on glutathione (Fig. 9B).

Analysis of SA in the same leaves revealed that, while all other *cat2*-carrying genotypes accumulated SA to around $20 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight in leaves 4 and 5, SA remained at close to wild-type levels in *cat2 dhar1 dhar2* and in the quadruple mutant (Fig. 9C). To assess the significance of this effect, the quadruple mutant was selected for an analysis of resistance to virulent bacteria. While bacterial growth was substantially lower in *cat2* than in the wild type, the simultaneous presence of the three *dhar* mutations caused partial loss of this induced resistance (Supplemental Fig. S8). Although no difference in bacterial growth was observed between Col-0 and *dhar1 dhar2 dhar3*, SA accumulated somewhat less in response to infection in the triple mutant (Supplemental Fig. S8). Similarly, the combined loss of

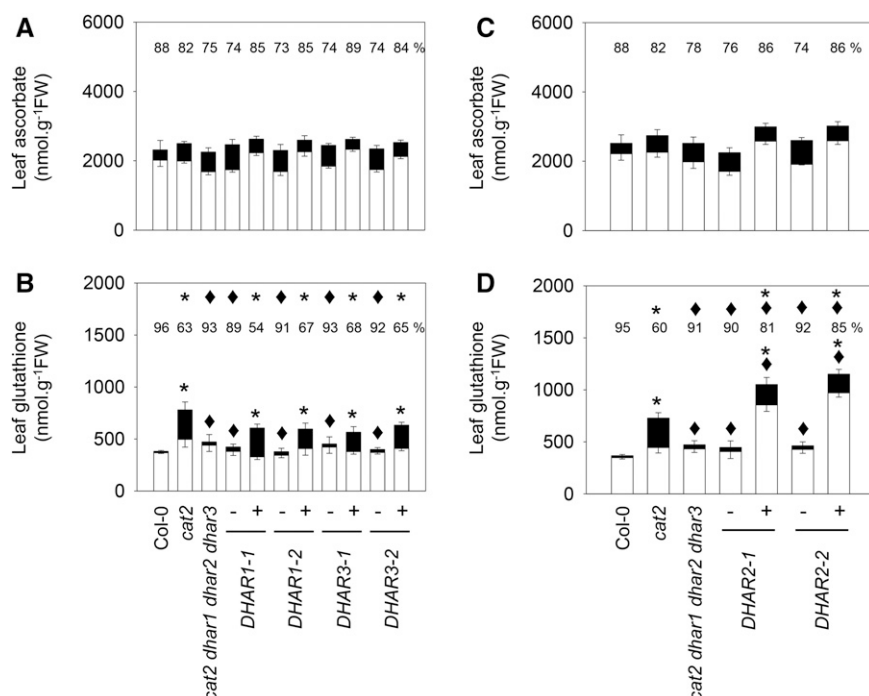


Figure 6. Ascorbate and glutathione in the *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* line complemented with *DHAR1*, *DHAR2*, or *DHAR3*. White bars, Reduced forms; black bars, oxidized forms; FW, fresh weight. A and B, *DHAR1* and *DHAR3* complemented lines. C and D, *DHAR2* complemented lines. Plants were grown on soil from germination in a 16-h/8-h day/night regime for 3 weeks. Plus or minus indicates the presence of absence of the transgene in the plants in which activity was measured. Data are means $\pm$ SE of between three and nine biological repeats. Asterisks indicate significant differences in total ascorbate or glutathione contents in mutants and complemented lines compared with Col-0, and diamonds indicate significant differences compared with *cat2*, at $P < 0.05$. Numbers above the columns indicate percentage reduced ($100 \times$ reduced form/total content). Above these numbers, asterisks indicate significant differences compared with Col-0, and diamonds indicate significant differences compared with *cat2*, at $P < 0.05$.

the three DHAR functions decreased SA accumulation following infection of the quadruple mutant compared with *cat2* (Supplemental Fig. S8).

DISCUSSION

This study was conducted with the aim of resolving several outstanding questions related to the importance of genes encoding DHAR and the functioning of the ascorbate-glutathione pathway in H_2O_2 processing. From a parallel analysis of a complete set of Arabidopsis mutants for the three DHAR-encoding genes, together with transformed lines complemented with each DHAR, we are led to the following conclusions.

Almost All of the Extractable DHAR Activity in Arabidopsis Leaves Is Attributable to Cytosolic DHAR1 and Chloroplastic DHAR3

In addition to the chloroplast and cytosol, DHAR activity has been reported in purified pea (*Pisum sativum*) peroxisomes and mitochondria (Jiménez et al., 1997). Targeting experiments in Arabidopsis have established that these organelles contain APX, MDHAR, and GR, in some cases as a result of dual targeting with the chloroplast or cytosol (Chew et al., 2003; Kataya and Reumann, 2010). Although DHAR1 does not contain a known peroxisomal targeting sequence, it was assigned a localization in this organelle on the basis of proteomics analyses and experiments with yellow fluorescent protein (YFP) fused to the DHAR1 C terminus (Reumann et al., 2009). For

unknown reasons, we were unable to recover GFP-DHAR1 plants. However, we could not find any evidence that the protein is found in organelles from analysis of lines transformed with constructs with GFP fused to the DHAR1 C terminus. Our data suggest that DHAR1 is a cytosolic protein, in agreement with another study using YFP (Grefen et al., 2010). If so, two of the Arabidopsis DHARs would be cytosolic, as DHAR2 was clearly located in this compartment, whether the GFP was fused N or C terminally.

A pea gene encoding GR was the first to be shown to encode targeting sequences directing dual localization in the chloroplast and mitochondria (Creissen et al., 1995). This observation was confirmed in Arabidopsis, where APX, MDHAR, and DHAR activities also were detected in mitochondria (Chew et al., 2003). In our study here, DHAR3-GFP signals were clearly associated with the chloroplast but not the mitochondria. Our study, therefore, suggests that the leaf DHAR activity in Arabidopsis is distributed approximately equally between the cytosol and the chloroplast, linked mainly to the activities of DHAR1 and DHAR3, respectively. A minor contribution to the cytosolic activity would come from DHAR2. This is consistent with two recent reports on single *dhar* mutants (Noshi et al., 2016, 2017) but in contrast to an earlier analysis of *dhar2* (Yoshida et al., 2006).

The subcellular distribution we report for the Arabidopsis DHARs is consistent with earlier predictions (Dixon et al., 2002) as well as with information available for the three poplar genes (Tang and Yang, 2013). Localization of DHARs was recently compared in maize (*Zea mays*), *Picea abies*, and *Selaginella moellendorffii* (Zhang et al., 2015). All three species contained one

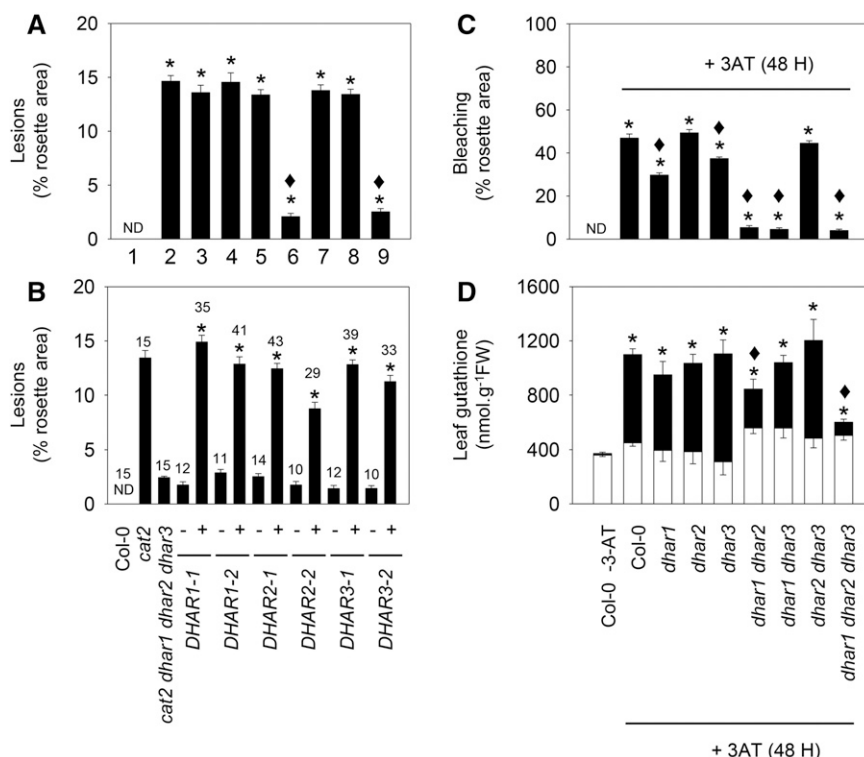


Figure 7. Influence of *dhar* mutations on lesions triggered by the *cat2* mutation (left) or by the catalase inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT; right). A, Effects of different *dhar* mutant combinations on *cat2*-triggered lesions. Numbers indicate genotypes as follows: 1, Col-0; 2, *cat2*; 3, *cat2 dhar1*; 4, *cat2 dhar2*; 5, *cat2 dhar3*; 6, *cat2 dhar1 dhar2*; 7, *cat2 dhar1 dhar3*; 8, *cat2 dhar2 dhar3*; and 9, *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*. Asterisks indicate significant differences in percentage of lesions on *cat2* background mutant leaves compared with Col-0, and diamonds indicate significant differences when they were compared with *cat2*, at $P < 0.05$. ND, Not detected. Values are means $\pm$ SE of 15 plants. B, Quantification of lesions in the *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* quadruple mutant retransformed (+) or not (-) with *DHAR1*, *DHAR2*, or *DHAR3*. The number of plants analyzed in complemented lines is indicated above each bar. Asterisks indicate significant differences in percentage of lesions on the complemented line compared with the untransformed quadruple mutant. C, Extent of bleaching in Col-0 and different *dhar* mutant lines caused by exposure to 2 mM 3-AT. 3-AT was sprayed onto the leaf surface of 3-week-old plants, and lesions were quantified and samples taken 48 h later. Asterisks indicate significant effects of 3-AT treatment compared with nontreated Col-0, and diamonds indicate significant differences between treated *dhar* mutants and Col-0, at $P < 0.05$. Values are means $\pm$ SE of 30 plants. D, Leaf glutathione content after 3-AT treatment. White bars, reduced forms; black bars, oxidized forms; FW, fresh weight. Data are means $\pm$ SE of three plants. For total glutathione, asterisks indicate significant effects of 3-AT treatment compared with nontreated Col-0, and diamonds indicate significant differences between *dhar* mutants and Col-0, at $P < 0.05$.

gene encoding chloroplastic DHAR and either one or two genes encoding cytosolic isoforms, with a fourth gene in maize coding for a protein localized in the vacuole (Zhang et al., 2015). Interestingly, both of the DHARs we found to be cytosolic were identified in a proteomics study of proteins associating with the plasma membrane, along with several other GSTs and peroxidases (Marmagne et al., 2007). Proteins other than the three DHARs, such as certain glutaredoxins or GSTs (Chew et al., 2003; Dixon et al., 2009), may be responsible for DHAR activities reported previously to be associated with the peroxisomes and mitochondria. However, very low residual activities were detected in both the *dhar1 dhar2 dhar3* triple and *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* quadruple mutants (Figs. 1 and 2), indicating that other proteins probably have relatively low capacities.

Arabidopsis Can Maintain Leaf Ascorbate Pools and Redox States When DHAR Activity Is Negligible, Even in Conditions of Oxidative Stress

In agreement with our previous analyses, leaf ascorbate was highly reduced in Arabidopsis Col-0 (about 90%). A high ascorbate reduction state is predicted if most of the pool is found in compartments that contain nonlimiting regenerating systems dependent on more powerful reductants, such as ferredoxin, NAD(P)H, and glutathione (Foyer and Noctor, 2011, 2016). Previous studies in tobacco have implicated DHAR as a major player determining ascorbate redox state and contents. A DHAR-silenced tobacco line with a decrease of about 70% in leaf activity had a more oxidized ascorbate pool, while ascorbate was more reduced in strong overexpressors (Chen et al., 2003; Chen and

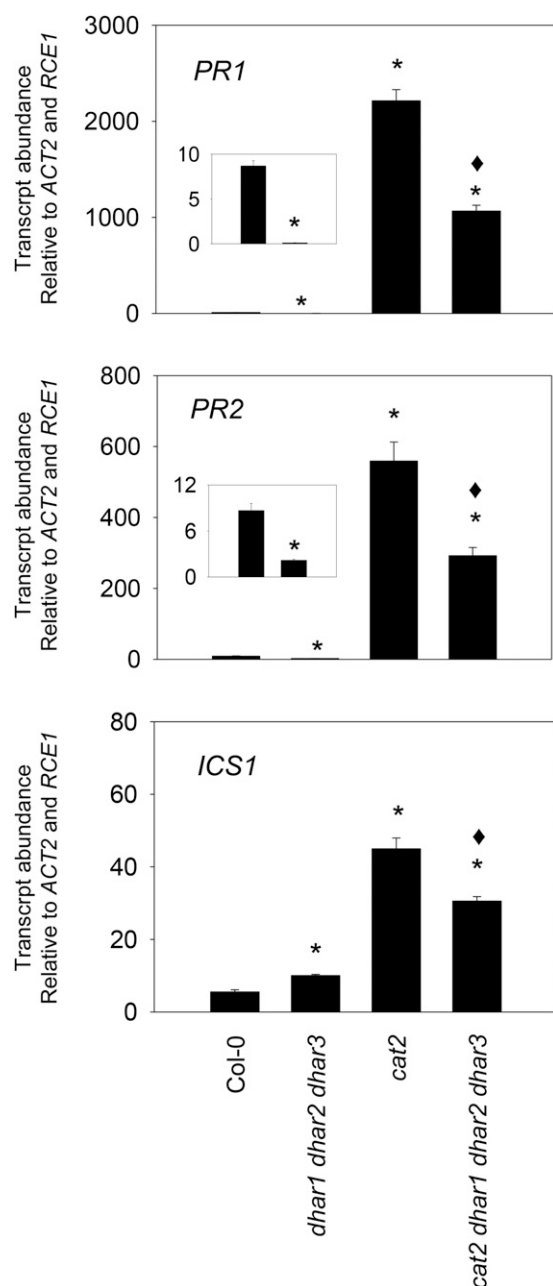


Figure 8. SA-linked gene expression in Col-0, *cat2*, and derived lines carrying all three *dhar* mutations. *PR1*, *PR2*, and *ICS1* transcripts were quantified by quantitative reverse transcription-PCR in 3-week-old plants using two reference genes (*ACTIN2* and *RCE1*). Inset graphs show Col-0 (left) and *dhar1 dhar2 dhar3* (right). Data are means $\pm$ SE of three biological replicates and have been multiplied by 100 for ease of expression. Significant differences between mutants and Col-0 at $P < 0.05$ are indicated by asterisks, while diamonds indicate significant differences between *cat2* and the quadruple mutant.

Gallie, 2004, 2006). The Arabidopsis genotypes reported here show decreases in DHAR activity from 10% to 100% as a result of gene-specific loss of function. In stark contrast to the studies in tobacco, we observed no marked effects on ascorbate contents or redox state.

Significantly enhanced oxidation, relative to *cat2*, was observed in some of the *cat2 dhar* lines but the effects were slight, with ascorbate remaining about 80% reduced (Supplemental Table S2). We cannot discount a role for DHARs in maintaining ascorbate in other conditions. For example, changes in ascorbate redox state were reported in *dhar1* and *dhar2* single mutants subjected to high light (Noshi et al., 2016, 2017). However, these effects were relatively slight. Our analysis, in which all combinations of the three *dhar* mutations were examined, provide little evidence for a major role for DHARs in maintaining ascorbate pools in Arabidopsis grown in moderate light with or without intracellular oxidative stress. The ability to maintain a largely reduced leaf ascorbate pool when DHAR activity is negligible may be explained by the presence of other routes that can either reduce DHA or else avoid its formation by reducing MDHA. Such mechanisms notably include nonenzymatic reduction of DHA by GSH and reduction of MDHA by chloroplast ferredoxin or by NAD(P)H-dependent reductases (Polle, 2001; Smirnoff, 2011; Gest et al., 2013; Johnston et al., 2015; Noctor, 2015).

DHARs Cooperate in Glutathione Oxidation Triggered by Oxidative Stress

Although complete loss of DHAR function in *dhar1 dhar2 dhar3* did not greatly affect ascorbate, it clearly impacted the responses to oxidative stress triggered by catalase deficiency. Accumulation of GSSG is the clearest and most readily quantifiable biochemical marker of altered redox state caused by a decreased capacity for the removal of intracellular H_2O_2 (Willekens et al., 1997; Queval et al., 2009, 2011). By comparison, reproducible increases in H_2O_2 itself are much more difficult to detect in *cat2* (Mhamdi et al., 2010a; Noctor et al., 2015). This suggests that, when catalase capacity is decreased, alternative H_2O_2 -reducing reactions are readily elicited, dampening increases in H_2O_2 and instead leading to the oxidation of key redox buffers such as glutathione. Exactly how this occurs remained unclear: DHARs are only one of several classes of GSH-dependent enzymes that could potentially be involved in H_2O_2 processing, and genes encoding several of these enzymes can be up-regulated alongside GSSG accumulation (Mhamdi et al., 2010a; Rahantaniaina et al., 2013). Given the differential oxidation of glutathione compared with ascorbate, one simple interpretation would be that GSH is coupled to H_2O_2 metabolism via pathways that are ascorbate independent, such as GSH-dependent peroxidases. Our data provide in planta evidence against this interpretation, because they show that at least one DHAR must be functional in order to observe a significant oxidation of glutathione when H_2O_2 availability is increased. If all three DHARs are knocked out, GSSG accumulation, whether induced pharmacologically or genetically, is almost completely inhibited (Figs. 6 and 7).

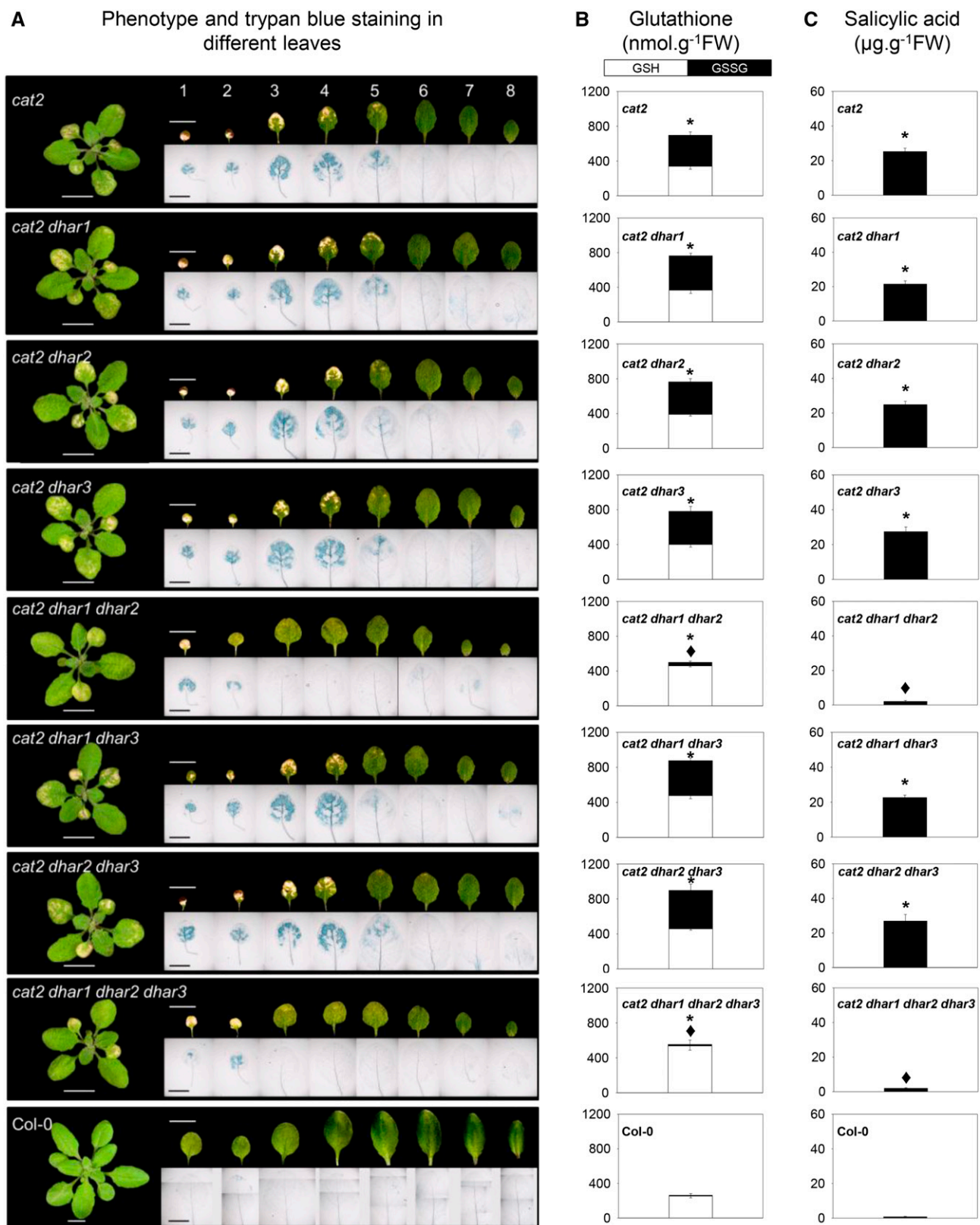


Figure 9. Detailed analysis of the effects of *dhar* mutations on the *cat2* phenotype and their relationship to localized glutathione status and SA contents. A, Photographs of rosette leaves and Trypan Blue staining for dead cells in the different mutants. Bars = 1 cm in leaf photographs and 5 mm in Trypan Blue photographs. B, Leaf glutathione contents in leaves 4 and 5. White bars, GSH;

Of the three double loss-of-function combinations, the clearest effect on glutathione status was observed for *dhar1 dhar2*. This underscores the potential importance of the cytosolic isoforms in coupling ascorbate and glutathione pools and is consistent with previous studies demonstrating the importance of cytosolic APX1 or GR1 in *cat2*-triggered responses (Mhamdi et al., 2010a; Vanderauwera et al., 2011). The importance of the cytosol in this context may be related to the peroxisomal location of the H_2O_2 that becomes available when catalase is deficient, although decreased glutathione oxidation also was reported for single *dhar1* and *dhar2* mutants after exposure to high light (Noshi et al., 2017). DHAR3 may be more significant in chloroplastic processing, although our data provide little evidence that this isoform plays a specific role in response to paraquat-induced oxidative stress, which largely originates in this organelle (Supplemental Fig. S3). Intriguingly, although glutathione was only marginally more oxidized in *cat2 dhar1 dhar2* than in *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*, the chloroplastic DHAR3 was just as effective as the cytosolic DHAR1 in restoring *cat2* glutathione status (Fig. 6). Differences between *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* DHAR3+, in which glutathione status was quite similar to *cat2* (Fig. 6), and *cat2 dhar1 dhar2*, in which GSSG accumulation was somewhat lower (Fig. 3), may reflect differences in DHAR3 expression levels. In any case, the ability of chloroplastic DHAR3 to complement the quadruple mutant raises questions about the potential importance of redox exchange across the inner envelope membrane. Chloroplasts have long been known to be competent in GSSG and DHA uptake (Anderson et al., 1983), and more recently, chloroplast envelope glutathione and ascorbate transporters have been identified in Arabidopsis (Maughan et al., 2010; Miyaji et al., 2015).

While our data provide in planta evidence that DHARs are important in coupling ascorbate and glutathione pools during oxidative stress, they also identify important questions for further study. The first relates to why ascorbate stays largely reduced even when glutathione is markedly oxidized and why DHAR function can affect glutathione but not ascorbate. Several factors may explain these observations. As discussed above, GSH-independent mechanisms exist for regenerating ascorbate, notably from MDHA, implying that a relatively minor part of ascorbate regeneration is linked to glutathione oxidation (Polle, 2001). Another important factor relates to differences in the compartmentation of the two antioxidants. In many cell compartments, glutathione and ascorbate are highly reduced under most conditions (Meyer et al., 2007;

Noctor et al., 2016), with DHA and GSSG accumulating at specific locations. Much of the GSSG accumulated during oxidative stress is found in the vacuole, thus allowing it to escape reduction by GR (Queval et al., 2011). We are currently investigating the processes responsible for this distribution, which may be significant in at least two respects. First, it could be crucial to allow GSSG generated in compartments such as the cytosol to be useful as a stable tissue marker of oxidative stress. Second, it may contribute to the homeostasis of the NADP(H)-glutathione redox couples and, therefore, influence cellular redox signaling.

The second question relates to the exact biochemical function of DHAR2. We found little genetic evidence that this protein is able to catalyze the GSH-dependent conversion of DHA to ascorbate. Extractable DHAR assays revealed little effect of either the *dhar2* mutation or of complementation with DHAR2. This is surprising because the recombinant DHAR2 has been shown to be competent in GSH-dependent reduction of DHA, albeit with lower specific activities compared with DHAR3 and, particularly, the other cytosolic isoform, DHAR1 (Dixon et al., 2002). Our study suggests that DHAR2 is active in GSH oxidation in planta, although we note that complementation of the *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* mutant with this protein produced a different glutathione signature from that observed when the mutant was complemented with DHAR1 or DHAR3. Further work will be required to elucidate this question, although we tentatively suggest that DHA is not the only physiological acceptor substrate for the DHAR2-dependent oxidation of GSH. This might explain why DHAR2 can contribute to glutathione oxidation in vivo even though the associated DHAR activity, measured in vitro, appears to be negligible.

Compromised DHAR Activity Uncouples Oxidative Stress from Activation of the SA Pathway

Loss of CAT2 function induces SA accumulation in the absence of pathogens and associated pathogenesis-related responses, including resistance to bacteria (Chaouch et al., 2010, 2012). The induction of these responses is influenced by glutathione status (Mhamdi et al., 2010a; Han et al., 2013a). Here, we show that when glutathione remains close to wild-type status (in *cat2 dhar1 dhar2* or the quadruple mutant), much of the SA response is abolished (Figs. 8 and 9). Thus, cooperation between the DHARs, and particularly the cytosolic forms, is required to couple oxidative stress to the activation of downstream signaling. The importance of

Figure 9. (Continued.)

black bars, GSSG; FW, fresh weight. Values are means $\pm$ SE of three biological replicates. C, SA contents in leaves 4 and 5. Values are means $\pm$ SE of six biological replicates. In B and C, asterisks indicate significant differences in total glutathione and SA contents in mutants compared with Col-0, and diamonds indicate significant differences between *cat2 dhar* mutants and *cat2*, at $P < 0.05$. For all these experiments, plants were grown for 3 weeks under 16 h of light/8 h of dark at an irradiance of $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 65% relative humidity.

the cytosolic isoforms could be linked to their partial recruitment to the plasma membrane (Marmagne et al., 2007), possibly to set appropriate conditions for redox signaling at this location. However, the close correlation between glutathione and SA contents (Fig. 9) suggests that the status of this key cellular thiol/disulfide compound also may be an important factor. If so, this would add to data showing that SA-related signaling is compromised in mutants for chloroplast-cytosol glutathione exchange (Maughan et al., 2010) and in *cat2* lines in which glutathione synthesis is partially blocked (Han et al., 2013a). It also provides further evidence that the activation of H₂O₂-triggered signaling inside the cell depends on a secondary modulation of antioxidant status, notably that of glutathione.

In conclusion, our study found no evidence for an essential role for any single DHAR but provided direct in planta evidence that coupling between ascorbate and glutathione is functionally important in H₂O₂ metabolism. DHARs seem to be dispensable for the maintenance of leaf ascorbate, even in stressful conditions. Rather, one function of these proteins may be to adjust intracellular glutathione status in oxidative stress conditions to ensure the appropriate activation of signaling through downstream pathways such as those involving SA. If so, these enzymes might more appropriately be named glutathione dehydrogenases rather than dehydroascorbate reductases.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials and Mutant Characterization

All the *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) mutants used in this study were in the Col-0 genetic background, and all seeds were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (<http://arabidopsis.info>). Lines carrying T-DNA insertions in the *DHAR1* (At1g19570), *DHAR2* (At1g75270), and *DHAR3* (At5g16710) genes were identified using insertion mutant information obtained from the SIGnAL Web site (<http://signal.salk.edu>). While T-DNA lines for *DHAR1* and *DHAR2* were obtained from the SALK collection (SALK_005238 and SALK_026089, respectively), the T-DNA line for *DHAR3* was from the SAIL collection (SAIL_435_A09). The *cat2* mutant was *cat2-1* (Queval et al., 2009). From these lines, the following resources were produced by crossing: *dhar1 dhar2*, *dhar1 dhar3*, *dhar2 dhar3*, *dhar1 dhar2 dhar3*, *cat2 dhar1*, *cat2 dhar2*, *cat2 dhar3*, *cat2 dhar1 dhar2*, *cat2 dhar1 dhar3*, *cat2 dhar2 dhar3*, and *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*. After verification of heterozygotes in F1 plants by PCR, double, triple, and quadruple homozygotes were identified similarly in the F2 generation and allowed to produce F3 seeds, which were used for experiments. Expression analyses were performed by semiquantitative reverse transcription-PCR. Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. RT and first-strand cDNA synthesis were performed using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). ACTIN2 transcripts were measured as a loading control. Primer sequences are listed in Supplemental Table S6.

Plasmid Constructs and Plant Transformation

Full-length cDNA clones of *Arabidopsis* DHARs were obtained from the RIKEN BioResource Center Arabidopsis full-length cDNA collection (<https://www.brc.riken.jp>). The cDNA clones encoding *DHAR1* (RAFL19-03-N19), *DHAR2* (RAFL09-83-E23), and *DHAR3* (RAFL19-84-K20) were moved as *SaII*-*NotI* fragments into the vector pENTR2b (Invitrogen) and sequenced, using primer pairs listed in Supplemental Table S6. An LR reaction was then used to transfer cDNAs from the resulting entry vectors to the appropriate Gateway binary destination vectors fused according to the manufacturer's instructions

(Invitrogen). The pB7WGF2 vector was used for N-terminal GFP fusion, and the pH7FWG2 vector was used for C-terminal GFP fusion (Karimi et al., 2002). In these constructs, the expression of *DHAR1*, *DHAR2*, or *DHAR3* was driven by the 35S promoter of *Cauliflower mosaic virus*. Purified plasmids were analyzed and sequenced to confirm successful fusion constructs. *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 pMP90 (Koncz and Schell, 1986) was transformed with confirmed binary vector constructs (Höfgen and Willmitzer, 1988) and used to transform developing floral tissues of 4-week-old *Arabidopsis* triple *dhar1 dhar2 dhar3* and quadruple *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* mutant plants using the floral dip method (Clough and Bent, 1998).

Subcellular Localization and Genetic Complementation

Ten-day-old seedlings of the triple *dhar1 dhar2 dhar3* and quadruple *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* mutants were stably transformed with *DHAR1*-GFP or GFP-*DHAR1*, *DHAR2*-GFP or GFP-*DHAR2*, and *DHAR3*-GFP or GFP-*DHAR3*. Transformed T1 seeds were germinated on agar and identified based on their resistance to hygromycin or were screened using a Leica dissecting microscope equipped with a mercury lamp and epifluorescence filter set (Karimi et al., 2002). Resistant and PCR-positive transgenic plants were transferred to a growth chamber and maintained up to the T2 generation, when segregation analysis was performed on complemented *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* lines. Two independent lines were selected and used for the analysis of enzyme activities, glutathione, and ascorbate.

To determine subcellular localization, leaf sections from T1 transformed plants were mounted onto a slide in water and imaging was performed with a Leica SP8 scanning confocal microscope using a 63× PLAN APO oil-immersion objective (numerical aperture, 1.4). GFP was excited with a 488-nm laser, and fluorescence was detected in a 493- to 530-nm detection window. As a chloroplast marker, chlorophyll autofluorescence was excited at 633 nm and detected at 698 to 748 nm. As peroxisome and dual chloroplast-mitochondrion markers, lines expressing GFP-MFP2 (A5 line; Cutler et al., 2000) or PDF1B-GFP (Giglione et al., 2000) were used. To check for possible mitochondrial localization, transformations were stained with the mitochondrion-selective probe MitoTracker Red (fluorescent dye; CMTMRos; Invitrogen) following the instruction manual. Fluorescence was excited with a 578-nm laser and detected in a 582- to 609-nm detection window. Both detection channels were recorded using hybrid detectors (Hamamatsu) with sequential acquisition to avoid any cross talk.

Plant Growth and Stress Treatments

For plants grown on soil, seeds were first incubated for 2 d at 4°C and then transferred to a controlled-environment growth chamber in a 16-h photoperiod and an irradiance of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at leaf level, 20°C/18°C, 65% humidity, and given nutrient solution twice per week. Unless stated otherwise, plants were sampled after 3 weeks of growth. Samples were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. All data are means $\pm$ SE of at least three biological replicates obtained from different plants, and experiments were repeated at least twice.

For in vitro stress treatments, seeds were sown on commercially available 0.5× Murashige and Skoog medium (basal salt mixture; M0221; Duchefa) solidified with 0.8% agar (Phyto-Agar HP696; Kalys) and grown in a 16-h-light/8-h-dark, 20°C growth chamber without sugar. Plants were grown vertically for 10 d on medium supplemented with 0, 10, or 50 μM CdCl₂, 50 or 100 mM NaCl, 100 or 200 mM mannitol, and 0.01 or 0.1 μM paraquat. For 3-AT treatment, seeds were sown on soil as described above. After 3 weeks, plant leaves were sprayed once with 2 mM 3-AT, then leaf samples were collected after 48 h and immediately frozen with liquid nitrogen for further analysis. To assess resistance to a virulent bacterium, plants grown in soil as above were inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *tomato* strain DC3000 as described by Chaouch et al. (2012) using a bacterial titer of 10⁶ colony-forming units mL⁻¹. Samples were taken for counting immediately after infiltration (0 h) or 48 h later. Quadruplicate biological samples, each of two leaf discs, were used.

Lesion Quantification, Trypan Blue Staining, and Pathogen Tests

Percentage lesion area in *cat2*, or bleaching induced by 3-AT treatment, was quantified using IQmaterials software. For Trypan Blue staining, rosette leaves

were infiltrated three times under vacuum with lactophenol trypan solution (2.5 mg mL⁻¹ Trypan Blue, 25% lactic acid, 23% water-saturated phenol, 25% glycerol, and water). Samples were then washed with distilled water and heated over boiling water. After cooling, samples were cleared with a chloral hydrate solution (8 g of chloral hydrate dissolved in 2 mL of 50% glycerol and 1 mL of water). The solution was replaced several times. Samples were mounted in chloral hydrate solution and observed with a macroscope (Nikon AZ100 Multizoom).

Transcript Quantification

Total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. RNA quality was determined by gel electrophoresis, and concentration was estimated using a Nanodrop spectrophotometer at 260 nm. RT and first-strand cDNA synthesis were performed using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Quantitative PCR was performed according to Queval et al. (2009). Primer sequences are listed in Supplemental Table S6.

Enzyme Assays and Metabolite Analysis

Extractable enzyme activities were measured according to protocols detailed by Noctor et al. (2016). Briefly, catalase was measured by the removal of H₂O₂ monitored at 240 nm, DHAR as GSH-dependent formation of ascorbate from DHA at 265 nm, APX as H₂O₂-dependent ascorbate oxidation at 290 nm, and GR as GSSG-dependent NADPH oxidation at 340 nm. Oxidized and reduced forms of glutathione and ascorbate were measured by plate-reader assay as described by Queval and Noctor (2007). Total SA was measured according to the protocol of Chaouch et al. (2010).

Accession Numbers

Sequences of genes studied in this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL data libraries under the following gene identifier codes: At1g19570 (DHAR1), At1g75270 (DHAR2), At5g16710 (DHAR3), At4g35090 (CAT2), At2g14610 (PR1), At3g57260 (PR2), At1g74710 (ICS1), At3g18780 (ACT2), and At4g36800 (RCE1).

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Genotyping and analysis of transcript abundance in *dhar* mutant lines.

Supplemental Figure S2. Photographs of *dhar* mutants after 3 weeks of growth.

Supplemental Figure S3. Effects of various stresses on root growth in *dhar* mutants.

Supplemental Figure S4. Subcellular localization of DHAR1 and DHAR3 in roots.

Supplemental Figure S5. Subcellular localization of DHARs in the absence of the *cat2* mutation.

Supplemental Figure S6. Comparison of DHAR1-GFP signals in leaves with a positive control for peroxisomal targeting.

Supplemental Figure S7. Phenotypes of Col-0 and *dhar* mutants 2 d after spraying with 3-AT.

Supplemental Figure S8. Effect of *dhar1 dhar2 dhar3* triple mutation on resistance to *P. syringae* pv *tomato* DC3000 in the Col-0 and *cat2* backgrounds.

Supplemental Table S1. Ascorbate and glutathione redox states in Col-0 and *dhar* mutants.

Supplemental Table S2. Ascorbate and glutathione redox states in Col-0, *cat2*, and *cat2 dhar* mutants.

Supplemental Table S3. T2 segregation of DHAR-complemented lines growing in vitro on agar.

Supplemental Table S4. T2 segregation of lesion phenotypes in complemented lines growing in soil.

Supplemental Table S5. Glutathione redox states in Col-0 and *dhar* mutants after treatment with 3-AT.

Supplemental Table S6. DNA primer sequences used in this study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory for providing the sequence-indexed Arabidopsis T-DNA insertion mutants, the Nottingham Arabidopsis Stock Centre for supplying seed stocks, and RIKEN for cDNA clones; Alison Baker (University of Leeds) and Cécile Raynaud (Institute of Plant Sciences Paris-Saclay) for supplying reporter lines for control GFP experiments; Myroslawa Miginiac-Maslow for discussions and comments on the article in preparation; and Jean-Claude Pasquet for valuable practical advice and help.

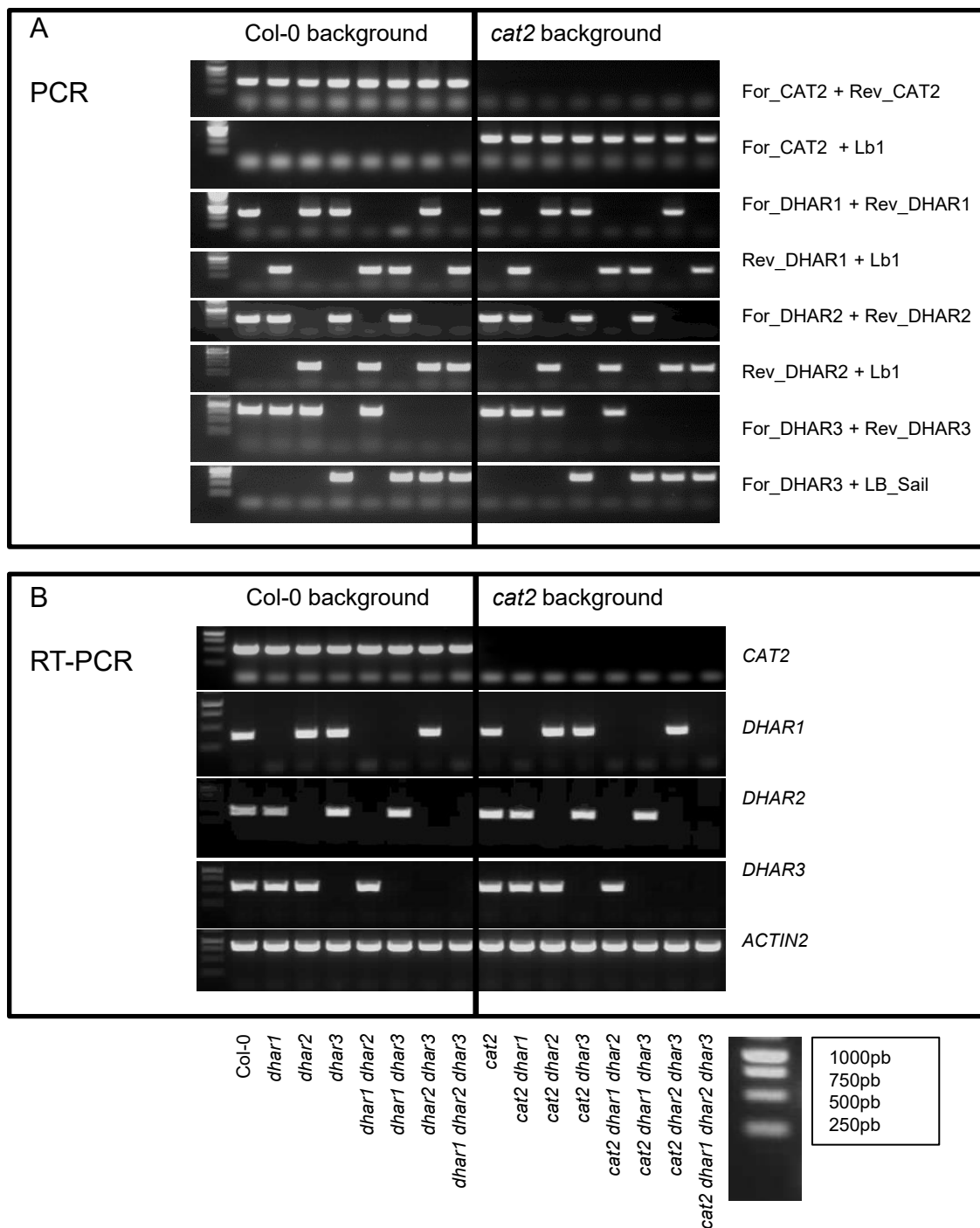
Received March 6, 2017; accepted April 1, 2017; published April 5, 2017.

LITERATURE CITED

- Anderson JW, Foyer CH, Walker DA (1983) Light-dependent reduction of dehydroascorbate and uptake of exogenous ascorbate by spinach chloroplasts. *Planta* **158**: 442–450
- Awad J, Stotz HU, Fekete A, Krischke M, Engert C, Havaux M, Berger S, Mueller MJ (2015) 2-Cysteine peroxiredoxins and thylakoid ascorbate peroxidase create a water-water cycle that is essential to protect the photosynthetic apparatus under high light stress conditions. *Plant Physiol* **167**: 1592–1603
- Chang L, Sun H, Yang H, Wang X, Su Z, Chen F, Wei W (2017) Overexpression of dehydroascorbate reductase enhances oxidative stress tolerance in tobacco. *Electron J Biotechnol* **25**: 1–8
- Chaouch S, Queval G, Noctor G (2012) AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in Arabidopsis. *Plant J* **69**: 613–627
- Chaouch S, Queval G, Vanderauwera S, Mhamdi A, Vandenabeele W, Noctor G, Van Breusegem F, Saindrenan P, Noctor G (2010) Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by ISOCHORISMATE SYNTHASE1 in a daylength-related manner. *Plant Physiol* **153**: 1692–1705
- Chen Z, Gallie DR (2004) The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell* **16**: 1143–1162
- Chen Z, Gallie DR (2006) Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiol* **142**: 775–787
- Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR (2003) Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 3525–3530
- Chew O, Whelan J, Millar AH (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J Biol Chem* **278**: 46869–46877
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–743
- Creissen G, Reynolds H, Xue Y, Mullineaux P (1995) Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J* **8**: 167–175
- Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffiths JS, Somerville CR (2000) Random GFP: cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3718–3723
- Dietz KJ, Mittler R, Noctor G (2016) Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. *Plant Physiol* **171**: 1535–1539
- Dixon DP, Davis BG, Edwards R (2002) Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants: identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **277**: 30859–30869
- Dixon DP, Edwards R (2010) Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book* **8**: e0131,

- Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ, Edwards R (2009) Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *J Exp Bot* **60**: 1207–1218
- Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21–25
- Foyer CH, Halliwell B (1977) Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochemistry* **16**: 1347–1350
- Foyer CH, Mullineaux PM (1998) The presence of dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase in plant tissues. *FEBS Lett* **425**: 528–529
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* **155**: 2–18
- Foyer CH, Noctor G (2016) Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect? *Plant Cell Environ* **39**: 951–964
- Gest N, Garchery C, Gautier H, Jiménez A, Stevens R (2013) Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a monodehydroascorbate reductase localized in peroxisomes and the cytosol. *Plant Biotechnol J* **11**: 344–354
- Giglione C, Serero A, Pierre M, Boisson B, Meinel T (2000) Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanisms. *EMBO J* **19**: 5916–5929
- Grefen C, Donald N, Hashimoto K, Kudla J, Schumacher K, Blatt MR (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J* **64**: 355–365
- Han Y, Chaouch S, Mhamdi A, Queval G, Zechmann B, Noctor G (2013a) Functional analysis of Arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H_2O_2 to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2106–2121
- Han Y, Mhamdi A, Chaouch S, Noctor G (2013b) Regulation of basal and oxidative stress-triggered jasmonic acid-related gene expression by glutathione. *Plant Cell Environ* **36**: 1135–1146
- Höfgen R, Willmitzer L (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res* **16**: 9877
- Hossain MA, Asada K (1984) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterisation as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol* **25**: 85–92
- Jiménez A, Hernández JA, Del Río LA, Sevilla F (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* **114**: 275–284
- Johnston EJ, Rylott EL, Beynon E, Lorenz A, Chechik V, Bruce NC (2015) Monodehydroascorbate reductase mediates TNT toxicity in plants. *Science* **349**: 1072–1075
- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**: 193–195
- Kataya AR, Reumann S (2010) Arabidopsis glutathione reductase 1 is dually targeted to peroxisomes and the cytosol. *Plant Signal Behav* **5**: 171–175
- Kato Y, Urano J, Maki Y, Ushimaru T (1997) Purification and characterisation of dehydroascorbate reductase from rice. *Plant Cell Physiol* **38**: 173–178
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of Ti-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**: 383–396
- Kwon SY, Ahn YO, Lee HS, Kwak SS (2001) Biochemical characterization of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Biochem Mol Biol* **34**: 316–321
- Kwon SY, Choi SM, Ahn YO, Lee HS, Lee HB, Park YM, Kwak SS (2003) Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Plant Physiol* **160**: 347–353
- Lallemant PA, Roret T, Tsan P, Gualberto JM, Girardet JM, Didierjean C, Rouhier N, Hecker A (2016) Insights into ascorbate regeneration in plants: investigating the redox and structural properties of dehydroascorbate reductases from *Populus trichocarpa*. *Biochem J* **473**: 717–731
- Le Martret B, Poage M, Shiel K, Nugent GD, Dix PJ (2011) Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase, exhibit altered anti-oxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance. *Plant Biotechnol J* **9**: 661–673
- Marmagne A, Ferro M, Meinel T, Bruley C, Kuhn L, Garin J, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G (2007) A high content in lipid-modified peripheral proteins and integral receptor kinases features in the *Arabidopsis* plasma membrane proteome. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1980–1996
- Maughan SC, Pasternak M, Cairns N, Kiddle G, Brach T, Jarvis R, Haas F, Nieuwland J, Lim B, Müller C, et al (2010) Plant homologs of the Plasmodium falciparum chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 2331–2336
- May MJ, Leaver CJ (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol* **103**: 621–627
- Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell R (2007) Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J* **52**: 973–986
- Mhamdi A, Hager J, Chaouch S, Queval G, Han Y, Taconnat Y, Saindrenan P, Issakidis-Bourguet E, Gouia H, Renou JP, et al (2010a) Arabidopsis GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol* **153**: 1144–1160
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2010b) Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* **61**: 4197–4220
- Miyaji T, Kuromori T, Takeuchi Y, Yamaji N, Yokosho K, Shimazawa A, Sugimoto E, Omote H, Ma JF, Shinozaki K, et al (2015) AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. *Nat Commun* **6**: 5928
- Morell S, Follmann H, De Tullio M, Häberlein I (1997) Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Lett* **414**: 567–570
- Noctor G (2015) Lighting the fuse on toxic TNT. *Science* **349**: 1052–1053
- Noctor G, Lelarge-Trouverie C, Mhamdi A (2015) The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry* **112**: 33–53
- Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2016) Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant Cell Environ* **39**: 1140–1160
- Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Foyer CH (2000) Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 1465–1475
- Noshi M, Hatanaka R, Tanabe N, Terai Y, Maruta T, Shigeoka S (2016) Redox regulation of ascorbate and glutathione by a chloroplastic dehydroascorbate reductase is required for high-light stress tolerance in Arabidopsis. *Biosci Biotechnol Biochem* **80**: 870–877
- Noshi M, Yamada H, Hatanaka R, Tanabe N, Tamoi M, Shigeoka S (2017) Arabidopsis dehydroascorbate reductase 1 and 2 modulate redox states of ascorbate-glutathione cycle in the cytosol in response to photooxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem* **81**: 523–533
- Parsons HT, Fry SC (2012) Oxidation of dehydroascorbic acid and 2,3-diketogulonate under plant apoplastic conditions. *Phytochemistry* **75**: 41–49
- Polle A (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling: computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol* **126**: 445–462
- Queval G, Jaillard D, Zechmann B, Noctor G (2011) Increased intracellular H_2O_2 availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ* **34**: 21–32
- Queval G, Noctor G (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Anal Biochem* **363**: 58–69
- Queval G, Thominet D, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Gakière B, Noctor G (2009) H_2O_2 -activated up-regulation of glutathione in Arabidopsis involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Mol Plant* **2**: 344–356
- Rahantaniaina MS, Tuzet A, Mhamdi A, Noctor G (2013) Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants? *Front Plant Sci* **4**: 477
- Reumann S, Quan S, Aung K, Yang P, Manandhar-Shrestha K, Holbrook D, Linka N, Switzenberg R, Wilkerson CG, Weber AP, et al (2009) In-depth proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. *Plant Physiol* **150**: 125–143

- Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP (2002) Glutaredoxin-dependent peroxidoreductase from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J Biol Chem* **277**: 13609–13614
- Shimaoka T, Yokota A, Miyake C (2000) Purification and characterization of chloroplast dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Plant Cell Physiol* **41**: 1110–1118
- Smirnoff N (2011) Vitamin C: the metabolism and functions of ascorbic acid in plants. *Adv Bot Res* **59**: 107–177
- Smith IK, Kendall AC, Keys AJ, Turner JC, Lea PJ (1984) Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci Lett* **37**: 29–33
- Tang ZX, Yang HL (2013) Functional divergence and catalytic properties of dehydroascorbate reductase family proteins from *Populus tomentosa*. *Mol Biol Rep* **40**: 5105–5114
- Tripathi BN, Bhatt I, Dietz KJ (2009) Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma* **235**: 3–15
- Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, van de Cotte B, Morsa S, Ravanat JL, Hegie A, Triantaphylidès C, Shulaev V, Van Montagu MCE, et al (2011) Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 1711–1716
- Wang Z, Xiao Y, Chen W, Tang K, Zhang L (2010) Increased vitamin C content accompanied by an enhanced recycling pathway confers oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol* **52**: 400–409
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J* **16**: 4806–4816
- Yin L, Wang S, Eltayeb AE, Uddin MI, Yamamoto Y, Tsuji W, Takeuchi Y, Tanaka K (2010) Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. *Planta* **231**: 609–621
- Yoshida S, Tamaoki M, Shikano T, Nakajima N, Ogawa D, Ioki M, Aono M, Kubo A, Kamada H, Inoue Y, et al (2006) Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for ozone tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **47**: 304–308
- Zhang YJ, Wang W, Yang HL, Li Y, Kang XY, Wang XR, Yang ZL (2015) Molecular properties and functional divergence of the dehydroascorbate reductase gene family in lower and higher plants. *PLoS ONE* **10**: e0145038

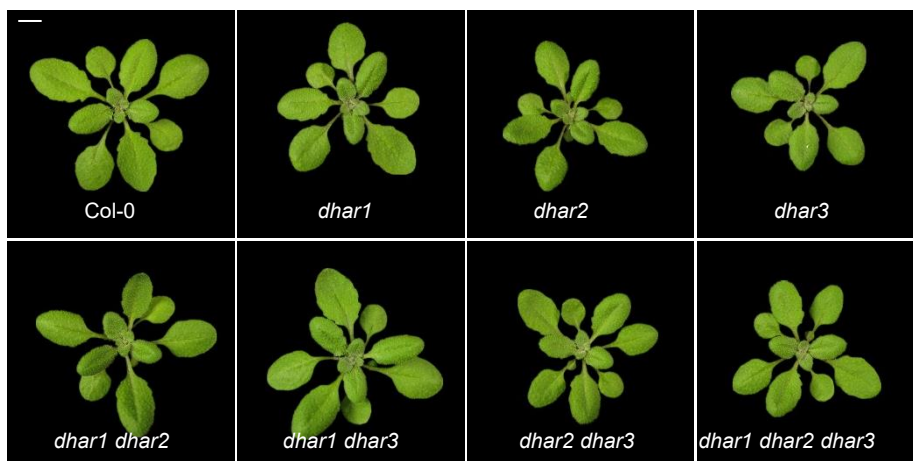


Supplemental Figure S1. Genotyping (A) and analysis of transcript abundance (B) in *dhar* mutant lines used in this study. The left half of the gels show data for *dhar* mutations in the Col-0 background, whereas plant lines shown on the right also carried the *cat2* mutation. Names of mutant lines are given at the bottom.

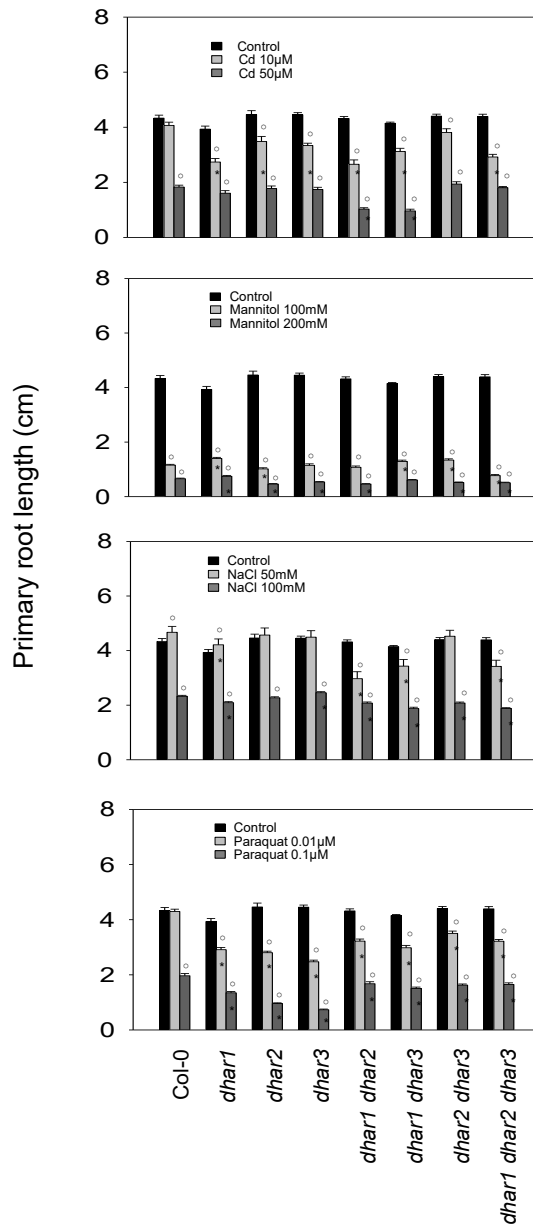
A, Plants were genotyped by PCR analysis.

B, Transcripts were measured by semi-quantitative RT-PCR

See Supplemental Table S6 for PCR and RT-PCR primers.

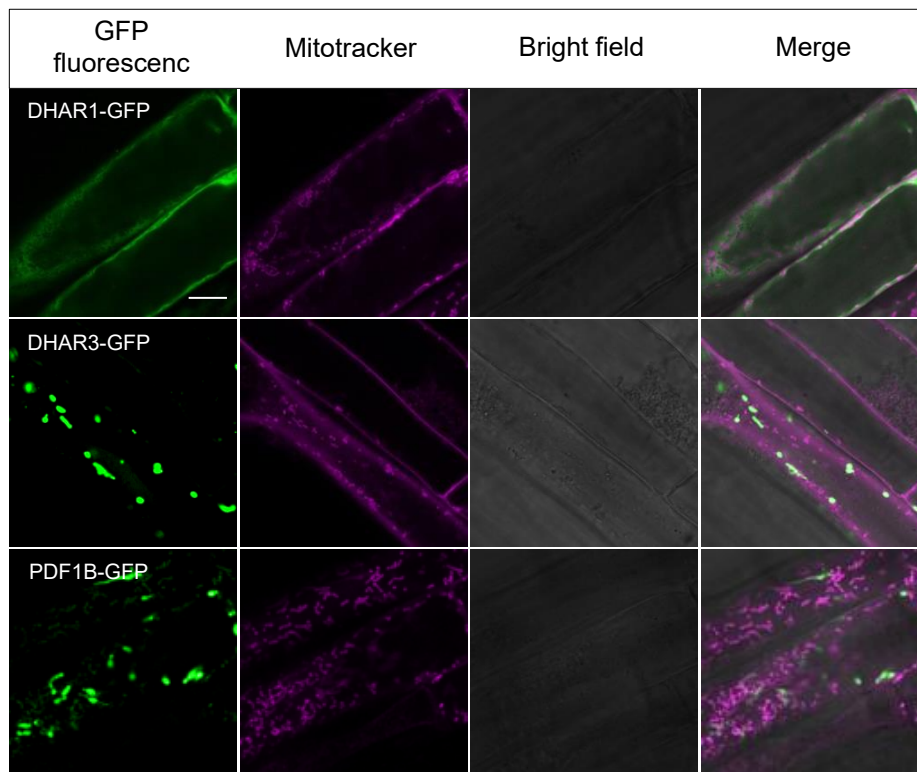


Supplemental Figure S2. Photographs of *dhar* mutants after three weeks growth at an irradiance of $200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in a 16h photoperiod. The white bar indicates 1 cm.

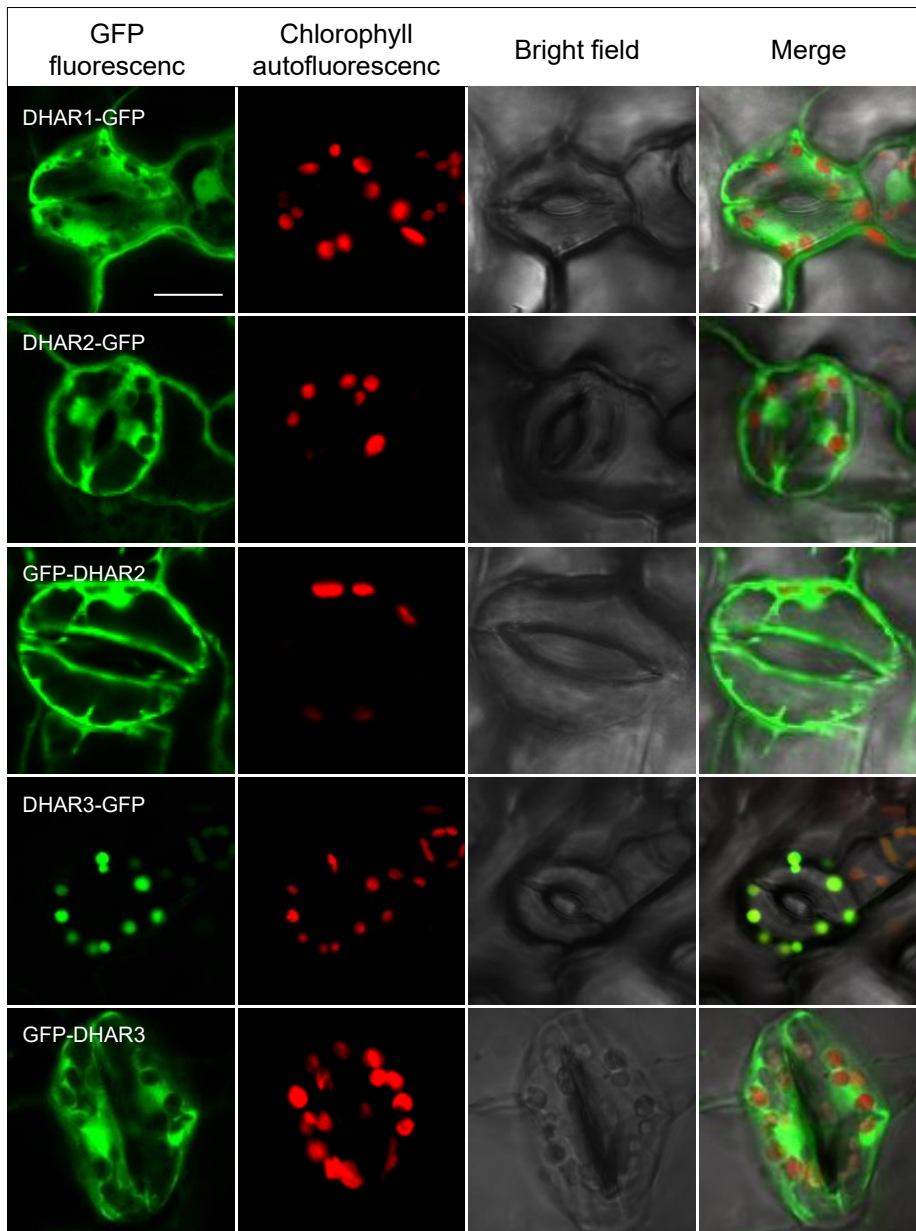


Supplemental Figure S3. Effects of various stresses on root growth in *dhar* mutants.

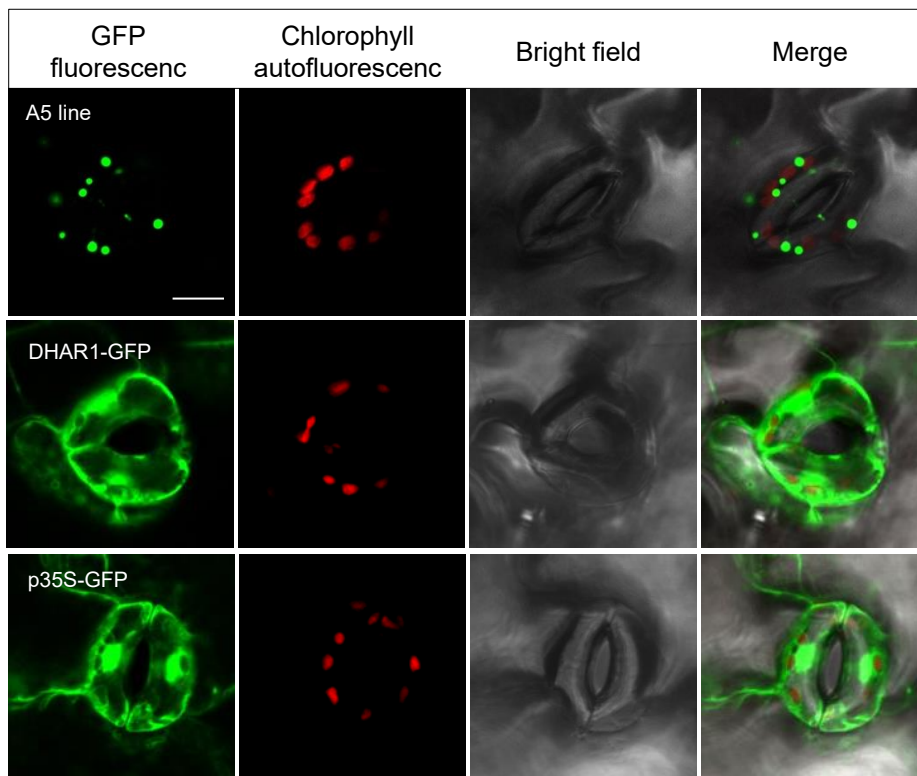
All data are means of 45 biological replicates. *Indicates significant impact of *dhar* mutation compared to Col-0 in the same stress condition (light gray and dark gray bars) and o indicates significant impact of stress in each line compared to control (black bars) at P-value < 0.05. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.



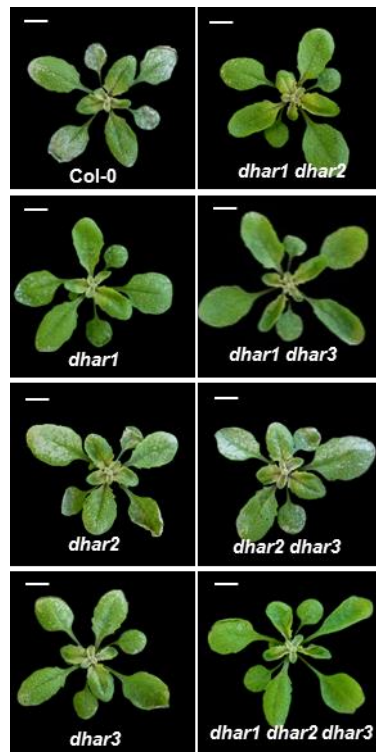
Supplemental Figure S4. Subcellular localization of DHAR1 and DHAR3 in roots. Comparison of DHAR1-GFP and DHAR3-GFP with the mitochondrial marker, mitotracker and the dual plastid-mitochondrion marker, PDF1B-GFP (Giglione et al., 2000). The scale bar indicates 10 μm .



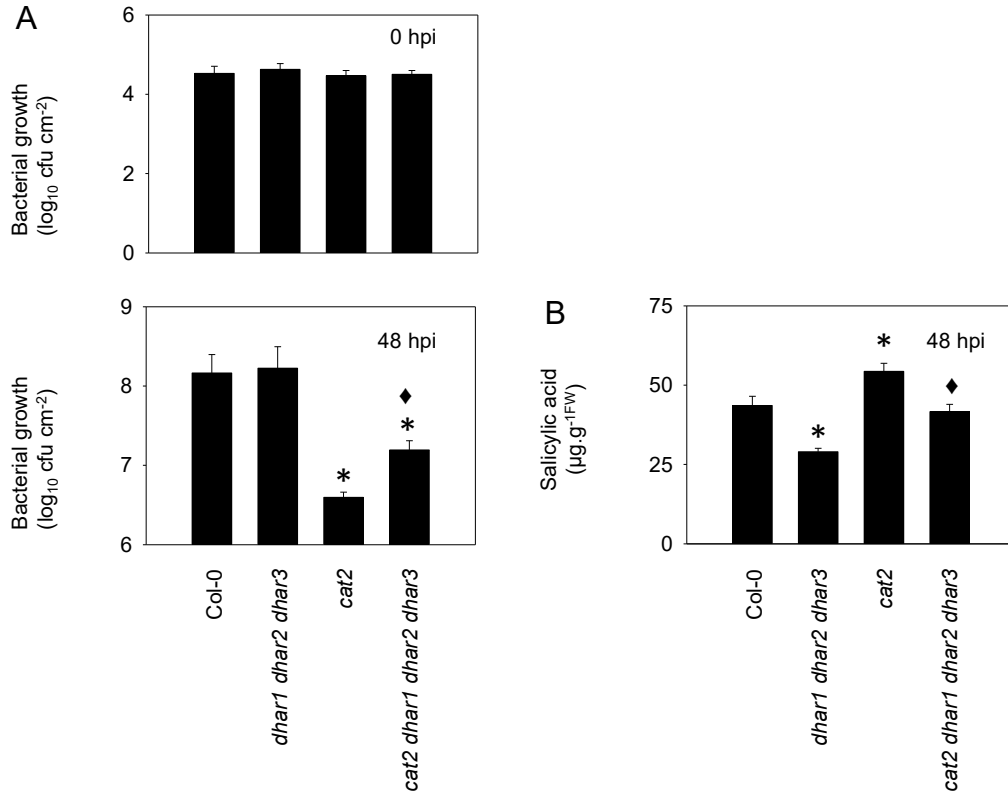
Supplemental Figure S5. Subcellular localization of DHARs in the absence of the *cat2* mutation. The indicated fusion proteins were expressed in the triple mutant *dhar1 dhar2 dhar3*. The images correspond to epidermal cells of the leaves of 10 day old seedlings. From left to right : GFP fluorescence (green), chlorophyll autofluorescence (red), bright field and merged images. The scale bar indicates 10 μ m.



Supplemental Figure S6. Comparison of DHAR1-GFP signals in leaves with a positive control for peroxisomal targeting. Fluorescence signals were examined in leaves of the *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* mutant transformed with the genes indicated, as follows. Top, positive control for peroxisomal targeting sequence 1 (A5 line; Cutler et al., 2000). Middle, DHAR1-GFP. Bottom, 35S-GFP. The scale bar indicates 10 μ m.



Supplemental Figure S7. Bleaching phenotypes of Col-0 and *dhar* mutants 2d after spraying with 3-AT. The scale bar indicates 1 cm.



Supplemental Figure S8. Effect of *dhar1 dhar2 dhar3* triple mutation on resistance to *Pto* DC3000 in the Col-0 and *cat2* backgrounds.

(A) Bacterial growth in the four genotypes. Top, 0 hours post-inoculation (hpi). Bottom, 48 hpi.

(B) Leaf salicylic acid at 48 hpi.

*Significant difference between mutant and Col-0 at $P < 0.05$. ♦ Significant difference between *cat2* and the quadruple mutant at $P < 0.05$.

Supplemental Table S1. Ascorbate and glutathione redox states in Col-0 and *dhar* mutants.

Data show 100 x (reduced form/total) and are means of three biological replicates. No significant differences were observed in *dhar* mutants compared to Col-0 at $P < 0.05$.

	Ascorbate	Glutathione
Col-0	87 ± 1.25	91 ± 1.23
<i>dhar1</i>	86 ± 0.61	88 ± 1.07
<i>dhar2</i>	88 ± 1.65	90 ± 0.51
<i>dhar3</i>	89 ± 4.34	86 ± 1.18
<i>dhar1 dhar2</i>	86 ± 1.36	90 ± 2.34
<i>dhar1 dhar3</i>	85 ± 3.11	90 ± 2.09
<i>dhar2 dhar3</i>	86 ± 1.51	91 ± 1.43
<i>dhar1 dhar2 dhar3</i>	83 ± 1.53	88 ± 0.31

Supplemental Table S2. Ascorbate and glutathione redox states in Col-0, *cat2* and *cat2 dhar* mutants

Data show 100 x (reduced form/total) and are means of three biological replicates. *Indicates significant difference compared to Col-0 while ⁺ indicates significant difference of *cat2 dhar* mutants compared to *cat2* at $P < 0.05$.

	Ascorbate	Glutathione
Col-0	89 ± 0.92	91 ± 2.67
<i>cat2</i>	85 ± 2.14	64 ± 0.82*
<i>cat2 dhar1</i>	84 ± 1.54*	59 ± 3.45*
<i>cat2 dhar2</i>	79 ± 1.21*	50 ± 2.21 ^{*/+}
<i>cat2 dhar3</i>	84 ± 2.05	61 ± 2.39*
<i>cat2 dhar1 dhar2</i>	82 ± 2.52	79 ± 2.02 ^{*/+}
<i>cat2 dhar1 dhar3</i>	82 ± 1.37*	58 ± 4.31*
<i>cat2 dhar2 dhar3</i>	84 ± 3.21	58 ± 2.93*
<i>cat2 dhar1 dhar2 dhar3</i>	80 ± 0.71*	86 ± 1.44 ⁺

Supplemental Table S3. T2 segregation of DHAR-complemented lines growing in vitro on agar.

Transformed plants were identified *in vitro* based on their resistance (R) or sensitivity (S) to hygromycin.

Lines	Total	Hygromycin R	Hygromycin S	χ^2 ($P < 0.05$)
<i>dhar1-1</i>	120	86	34	0.40
<i>dhar1-2</i>	116	88	28	0.83
<i>dhar2-1</i>	117	85	32	0.56
<i>dhar2-2</i>	120	85	35	0.29
<i>dhar3-1</i>	129	88	41	0.08
<i>dhar3-2</i>	114	92	22	0.16

Supplemental Table S4. T2 segregation of lesion phenotypes in complemented lines growing in soil.

Data show numbers of plants showing either the *cat2* lesion phenotype or the *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* phenotype in two independent experiments performed on plants growing in soil.

Expt 1		Phenotype		
Lines	Total	<i>cat2</i>	quadruple mutant	χ^2 ($P < 0.05$)
<i>dhar1-1</i>	44	33	11	1.00
<i>dhar1-2</i>	56	43	13	0.76
<i>dhar2-1</i>	47	36	11	0.80
<i>dhar2-2</i>	50	38	12	0.87
<i>dhar3-1</i>	46	35	11	0.86
<i>dhar3-2</i>	48	36	12	1.00

Expt 2		Phenotype		
Lines	Total	<i>cat2</i>	quadruple mutant	χ^2 ($P < 0.05$)
<i>dhar1-1</i>	47	35	12	0.93
<i>dhar1-2</i>	52	41	11	0.52
<i>dhar2-1</i>	57	43	14	0.94
<i>dhar2-2</i>	39	29	10	0.93
<i>dhar3-1</i>	51	39	12	0.81
<i>dhar3-2</i>	45	33	12	0.80

Supplemental Table S5. Glutathione redox states in Col-0 and *dhar* mutants after treatment with 3-amino-1,2,4-triazole.

Data show 100 x (reduced form/total) and are means of three biological replicates. *Indicates significant difference compared to Col-0 at $P < 0.05$.

Col-0	41 ± 3.61
<i>dhar1</i>	41 ± 5.00
<i>dhar2</i>	36 ± 6.28
<i>dhar3</i>	27 ± 6.40
<i>dhar1 dhar2</i>	66 ± 0.87*
<i>dhar1 dhar3</i>	54 ± 5.77
<i>dhar2 dhar3</i>	39 ± 2.97
<i>dhar1 dhar2 dhar3</i>	84 ± 2.75*

Supplemental Table S6. DNA primer sequences used in this study.

Oligonucleotide	Sequence	Technique
For_CAT2	5'-CCCAGAGGTACCTCTTCTCTCCCATG-3'	Genotyping
Rev_CAT2	5'-TCAGGGAACCTTCATCCCATCGC-3'	Genotyping
For_DHAR1	5'-TTAGGTCCGTTAGCCAAC-3'	Genotyping
Rev_DHAR1	5'-AAGCTCTCAGGGACAGACCAG-3'	Genotyping
For_DHAR2	5'-AATGGGTGGCTGATTCTGAC-3'	Genotyping
Rev_DHAR2	5'-GATCCACATCACGCATTAC-3'	Genotyping
For_DHAR3	5'-GTTACTGACAATGGAGGAGAAG-3'	Genotyping
Rev_DHAR3	5'-GTGCCAAGGACAAATCTGC-3'	Genotyping
Lb1	5'-TGGACCGCTTGCTGCAACTCTC-3'	Genotyping
LB_Sail	5'-GAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3'	Genotyping
For_Actin2	5'-TTCCCTCAGCACATTCCAGCAG-3'	RT-PCR
Rev_Actin2	5'-TTAACATTGCAAAGAGTTTCAAGG-3'	RT-PCR
For_CAT2	5'-GTGCTGACTTTCTCCGAGCT-3'	RT-PCR
Rev_CAT2	5'-CCTGAACCATCCATGTGCCT-3'	RT-PCR
For_DHAR1	5'-TGGCTCTGGAAATCTGTG-3'	RT-PCR
Rev_DHAR1	5'-AGCAAGGCATGTTTCAATCC-3'	RT-PCR
For_DHAR2	5'-AATGGGTGGCTGATTCTGAC-3'	RT-PCR
Rev_DHAR2	5'-CCGCAACCACAATCTCTTTC-3'	RT-PCR
For_DHAR3	5'-GTTACTGACAATGGAGGAGAAG-3'	RT-PCR
Rev_DHAR3	5'-GTGCCAAGGACAAATCTGC-3'	RT-PCR
For_Actin2	5'-CTGTACGGTAACATTGTGCTCAG -3'	RT-qPCR
Rev_Actin2	5'-CCGATCCAGACACTGTACTTCC -3'	RT-qPCR
For_RCE1	5'-CTGTTACGGAACCCAATTC-3'	RT-qPCR
Rev_RCE1	5'-GGAAAAAGGTCTGACCGACA-3'	RT-qPCR
For_PR1	5'-AGGCTAACTACAACCTACGCTGCG-3'	RT-qPCR

Rev_PR1	5'-GCTTCTCGTTCACATAATCCCAC-3'	RT-qPCR
For_PR2	5'-TCAAGGAGCTTAGCCTCACC-3'	RT-qPCR
Rev_PR2	5'-CGCCTAGCATCCCGTAGC-3'	RT-qPCR
For_ICS1	5'-TTGGTGGCGAGGAGAGTG-3'	RT-qPCR
Rev_ICS1	5'-CTTCCAGCTACTATCCCTGTCC-3'	RT-qPCR

Amplification with stop codon

For_Sall_DHAR1	5'-GCGCGTCGACAAATGGCTCTGGAAATCTGTGTG-3'	Cloning
Rev_DHAR1_stop_NotI	5'-TTTTGCGGCCGCTTTCAAGGGTTAACCTTGGGAG-3'	Cloning
For_Sall_DHAR2	5'-ACGCGTCGACGTATGGCTCTAGATATCTGCGTGAAGG-3'	Cloning
Rev_DHAR2_stop_NotI	5'-ATTTGCGGCCGCTTTCACGCATTACCTTCG-3'	Cloning
For_Sall_DHAR3	5'-ACGCGTCGACGTATGATAAGCCTTAGGTTCAACCAAGC-3'	Cloning
Rev_DHAR3_stop_NotI	5'-ATTTGCGGCCGCTTTTAACCCATAACCTTTGGTCTCC-3'	Cloning

Amplification without stop codon

For_Sall_DHAR1	5'-GCGCGTCGACAAATGGCTCTGGAAATCTGTGTG-3'	Cloning
Rev_DHAR1_NotI	5'-TTTTGCGGCCGCTTAGGGTTAACCTTGGGAG-3'	Cloning
For_Sall_DHAR2	5'-ACGCGTCGACGTATGGCTCTAGATATCTGCGTGAAGG-3'	Cloning
Rev_DHAR2_NotI	5'-ATTTGCGGCCGCTTCGCATTACCTTCGATTC-3'	Cloning
For_Sall_DHAR3	5'-ACGCGTCGACGTATGATAAGCCTTAGGTTCAACCAAGC-3'	Cloning
Rev_DHAR3_NotI	5'-ATTTGCGGCCGCTTACCCATAACCTTTGGTCTCC-3'	Cloning
For_pENTR2B	5'-CCAGGCATCAAATAAGCAG-3'	Cloning
Rev_pENTR2B	5'-CTTGTGCAATGTAACATCAGAG-3'	Cloning

II.2.2. Discussion et Transition 2

La voie ascorbate-glutathion se présente comme étant un des meilleurs candidats des voies antioxydantes glutathion-dépendantes d'après notre première étude (**Article 1**). Cependant, nous savons que le couplage entre l'ASC et le GSH reste encore peu connu (voir **Partie I, Section I.2.4.2.3**). Outre leur réaction chimique directe, les DHARs pourraient jouer un rôle important dans le couplage entre l'ASC et le GSH puisque leur action permet de régénérer l'ASC en oxydant le GSH. Dans ce travail, nous avons pu, par une approche génétique, apporter quelques éléments de réponse et différencier les contributions des différentes isoformes de DHAR.

En analysant l'ensemble des mutants d'*Arabidopsis* combinant les trois gènes de DHAR, ainsi que des lignées transgéniques complémentées avec chaque DHAR, il résulte que la DHAR1 cytosolique et la DHAR3 chloroplastique assurent la quasi-totalité de l'activité extractible de la DHAR dans les feuilles d'*Arabidopsis* (**Article 2**, Figs 1A et 2A). La DHAR2 apporte une faible contribution à l'activité foliaire (**Article 2**, Figs 1A et 2A). La complémentation du quadruple mutant *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* avec le gène de la DHAR2 ne permet pas de restaurer l'activité DHAR, contrairement à la complémentation avec la DHAR1 ou la DHAR3 (**Article 2**, Fig. 5). Pourtant, chez le mutant *cat2*, nous avons vu que *DHAR2* est significativement induit (**Article 1**). Même si d'autres analyses seront nécessaires pour élucider ce point étonnant, nous avons suggéré que le DHA n'est peut-être pas le seul substrat accepteur physiologique de la DHAR2. En effet, quand nous avons dosé l'activité foliaire extractible de l'enzyme, nous avons imposé le DHA comme substrat (voir protocole détaillé dans la **Partie V, Section V.2.2.1.6**) et conclu que l'activité attribuable à DHAR2 était négligeable.

Les questions, initialement posées, étaient de savoir dans quelle mesure l'ascorbate et le glutathion sont couplés *in planta*, et laquelle des réactions des trois DHAR oxyde le glutathion dans différentes conditions physiologiques ? Nos résultats démontrent, tout d'abord, que les DHAR semblent ne pas jouer un rôle majeur dans le maintien du statut de l'ascorbate foliaire, aussi bien en conditions optimales de croissance qu'en situation de stress oxydant (**Article 2**, Figs 1C et 3). Nous avons vu que l'activité DHAR peut être réduite à des niveaux négligeables, chez le double mutant *dhar1 dhar3*, les triples mutants *dhar1 dhar2 dhar3* (**Article 2**, Fig. 1A), chez *cat2 dhar1 dhar3* et même chez le quadruple mutant *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* (**Article 2**, Fig. 2A), qui sont sans effet sur les pools d'ascorbate. Cette capacité à maintenir un pool d'ascorbate largement réduit en absence de DHAR peut s'expliquer par l'action d'autres voies qui peuvent soit réduire le DHA, soit, éviter sa formation en réduisant le MDHA. En effet, une réduction non-enzymatique de DHA par le GSH peut se faire. D'autre part, dans les chloroplastes, le MDHA peut être réduit en ASC de manière ferrédoxine-dépendante. En outre, les MDHAR qui utilisent le pouvoir réducteur du NAD(P)H peuvent aussi réduire le MDHA (Polle, 2001, Gest et al., 2013, Johnston et al., 2015, Noctor, 2015). Ce point sera approfondi dans la **Sous-partie II.4**.

A l'inverse de l'ascorbate, le statut du glutathion est gravement impacté par la perte de fonctions de certaines DHARs. L'absence des deux isoformes cytosoliques, la DHAR1 et la DHAR2, provoque une diminution nette de l'oxydation du glutathion en situation de stress (**Article 2**, Figs 3 et 7D). Ce résultat appuie l'importance potentielle des enzymes cytosoliques dans le couplage des pools d'ascorbate et de glutathion, et il est cohérent avec les études précédentes démontrant l'importance de l'APX1 ou de la GR1 dans les réponses déclenchées par

le H_2O_2 chez *cat2* (Mhamdi et al., 2010b; Vanderauwera et al., 2011). A défaut d'une fonction liée à l'ascorbate, dans l'état actuel de nos connaissances, nous pouvons proposer que la fonction des DHARs, serait d'ajuster le statut du glutathion intracellulaire dans des conditions de stress oxydant (**Article 2**, Figs 3 et 7D). Nous proposons donc de nommer les DHARs des « glutathion déshydrogénases » plutôt que des déhydroascorbate réductases.

Cependant, nous n'excluons pas totalement un rôle des DHARs dans le couplage ascorbate-glutathion car nous avons vu qu'il faut au moins une DHAR fonctionnelle pour que l'oxydation du glutathion se produise en situation de charge élevée en H_2O_2 . Nous pouvons préciser, à ce sujet, que l'oxydation du glutathion via les DHARs contribue pour une part relativement faible à la régénération de l'ascorbate. En plus du fait que l'ASC peut être régénéré indépendamment du GSH, la répartition subcellulaire des deux réducteurs fait que la modification du statut du glutathion ne joue pas nécessairement sur celui de l'ascorbate. En effet, dans l'équipe, nous avons déjà observé qu'une grande partie du GSSG produit au cours du stress oxydant chez *cat2* se retrouve accumulée dans la vacuole (Queval et al., 2011 ; Noctor et al., 2013). Puis comme aucune GR n'a été trouvée dans ce compartiment, le GSSG pourrait donc échapper à sa réduction ce qui influence l'état redox du glutathion. Dans sa forme séquestrée, le glutathion devrait être sans effet sur le statut de l'ascorbate. Ce point sera également examiné dans la **Sous-partie II.4**.

Nous avons vu précédemment dans la **Partie I, Section 1.2.5.5**, que le glutathion joue un rôle très important en intégrant la signalisation redox et la voie de signalisation de l'acide salicylique, les DHARs en jouant sur le statut du glutathion pourraient donc être importantes dans ce contexte. Les études menées sur *cat2*, où la synthèse du glutathion est partiellement bloquée ont déjà montré ces effets (Han et al., 2013a). Dans un fond génétique *cat2*, l'absence des DHARs cytosoliques, ramène le statut du glutathion à la normale, c'est-à-dire essentiellement réduit (**Article 2**, Figs. 8 et 9) et une grande partie de l'accumulation du SA observée chez *cat2* est abolie (**Article 2**, Figs. 8 et 9). Le statut du glutathion influence donc l'accumulation de SA, même en l'absence de pathogène (**Article 2**, Fig. 9). Nous avons aussi observé qu'il influence sur les réponses géniques associées à la pathogenèse (**Article 2**, Fig. 8), et la résistance aux bactéries (**Article 2**, Fig. S8). Nos résultats mettent donc en évidence que les DHARs, particulièrement les isoformes cytosoliques, sont indispensables pour le contrôle du statut du glutathion en situation de stress, et que ce statut détermine le couplage du stress oxydant à l'activation de la signalisation en aval.

Compte tenu de l'importance établie du statut du glutathion, par la suite, nous avons jugé intéressant d'étudier l'impact des autres voies utilisant le GSH dans le métabolisme du H_2O_2 (vu dans l'**Article 1**) sur son couplage avec la signalisation oxydative chez les plantes. La **Sous-partie II.3** qui suit apporte quelques éléments complémentaires à ce sujet.

II. Résultats

II.3. Analyse des rôles des gènes de glutathion *S*-transférases et de peroxyrédoxines candidats dans l'oxydation du glutathion

II.3.1 Préambule 3

Comme nous avons vu précédemment, le glutathion est une molécule clé dans le stress oxydant chez la plante face aux contraintes environnementales, et nous avons mis en évidence l'importance de son potentiel redox et son rôle dans la transmission du signal ROS. Son niveau d'oxydation reflète son activité métabolique et nous avons vu que les différentes voies possibles pour oxyder le glutathion sont nombreuses. La plus privilégiée semble être celle liée à la voie ascorbate-glutathion via l'action des DHARs.

Dans l'étude qui suit, j'ai complété mes analyses en m'intéressant à deux autres voies candidates: celle médiée par les glutathion S-transférases (GST) et celle par les peroxyrédoxines de type II (PRXII) glutarédoxine-(GRX)-dépendantes. Comme précédemment, j'ai utilisé des mutants perte de fonction. Pour la voie GST, trois gènes ont été étudiés : le *GSTU8*, le *GSTU24* et le *GSTF8*. *GSTU25* faisait partie des gènes candidats déterminés dans notre étude précédente (**Article 1**), mais la non disponibilité de mutants knock-out pour ce gène a fait que je me suis plutôt intéressée à GSTF8 qui a une activité peroxydase assez importante et dont le gène est induit chez le mutant *cat2* (**Article 1**). Pour les PRXsII, j'ai travaillé sur les mutants des deux gènes *PRXIIIE* et *PRXIIF*. L'analyse présentée dans l'**Article 1** n'a pas révélé de candidats à privilégier dans la famille des PRXsII GRX-dépendantes pour oxyder le glutathion, cependant nos études comparatives des paramètres biochimiques ont tout de même révélé que, même si la constante catalytique k_{cat} des PRXsII est bien plus faible (d'un facteur 100 environ) que celle des APXs les deux systèmes enzymatiques ont des affinités avoisinantes pour les peroxydes ($K_M^{H_2O_2}$ de l'ordre de 20 μ M ; Tableau 4, **Article 1**).

Afin de comprendre leur rôle et donc leur importance en réponse au stress oxydant, un ensemble de plantes mutantes, aussi bien des simples *gstU8*, *gstU24*, *gstF8*, *prxIIIE*, *prxIIF* que des doubles mutants *gstU8 gstU24*, *gstU8 gstF8*, *gstU24 gstF8*, *prxIIIE prxIIF*, a été traité au 3-aminotriazole par pulvérisation au bout de trois semaines de développement. Cette molécule est un inhibiteur de la catalase et induit une accumulation de peroxyde d'hydrogène dans les tissus, provoquant un stress oxydant. Deux jours après le traitement, les plantes ont été photographiées puis échantillonnées et analysées. Les résultats des analyses sont présentés dans l'**Article 3**. Ils viennent compléter ceux présentés dans l'**Article 2** puisque nous avons intégré à cette étude les mutants DHARs.

En outre, nous avons souhaité apporter plus de précisions quant aux rôles des DHAR évoqués dans l'**Article 2**. Plus précisément, nous avons cherché à évaluer la possibilité que les effets de la perte de fonction DHAR soient liés à d'éventuels mécanismes indirects résultant de compensations secondaires dans les mutants. Pour cela, nous avons mesuré l'expression des GRs ainsi que l'expression et l'activité des MDHARs pour déterminer si l'oxydation du glutathion par la voie ascorbate-glutathion était directement induite par la perte d'activité enzymatique des DHARs, ou plus indirectement par une régulation positive d'autres enzymes impliquées dans le recyclage du glutathion et de l'ascorbate.

ARTICLE 3

Glutathione oxidation in response to intracellular H₂O₂: key but overlapping roles for dehydroascorbate reductases.

Rahantaniaina MS, Li S, Chatel-Innocenti G, Tuzet A, Mhamdi A, Vanacker H, Noctor G

Plant Signal Behav (2017) 12, e1356531.

SHORT COMMUNICATION



Glutathione oxidation in response to intracellular H₂O₂: Key but overlapping roles for dehydroascorbate reductases

Marie-Sylviane Rahantaniaina^a, Shengchun Li^{a,†}, Gilles Chatel-Innocenti^a, Andrée Tuzet^b, Amna Mhamdi^{a,‡}, Hélène Vanacker^a, and Graham Noctor^a

^aInstitute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), UMR 9213/UMR1403, Université Paris-Sud, CNRS, INRA, Université d'Evry, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Bâtiment 630, Orsay, France; ^bUnité Mixte de Recherche ECOSYS / Pôle BIOCLIMATOLOGIE, INRA – AgroParisTech, Route de la Ferme, Thiverval-Grignon, France

ABSTRACT

Glutathione is a pivotal molecule in oxidative stress, during which it is potentially oxidized by several pathways linked to H₂O₂ detoxification. We have investigated the response and functional importance of 3 potential routes for glutathione oxidation pathways mediated by glutathione S-transferases (GST), glutaredoxin-dependent peroxiredoxins (PRXII), and dehydroascorbate reductases (DHAR) in *Arabidopsis* during oxidative stress. Loss-of-function *gstU8*, *gstU24*, *gstF8*, *prxII*E and *prxII*F mutants as well as double *gstU8 gstU24*, *gstU8 gstF8*, *gstU24 gstF8*, *prxII*E *prxII*F mutants were obtained. No mutant lines showed marked changes in their phenotype and glutathione profiles in comparison to the wild-type plants in either optimal conditions or oxidative stress triggered by catalase inhibition. By contrast, multiple loss of DHAR functions markedly decreased glutathione oxidation triggered by catalase deficiency. To assess whether this effect was mediated directly by loss of DHAR enzyme activity, or more indirectly by upregulation of other enzymes involved in glutathione and ascorbate recycling, we measured expression of glutathione reductase (GR) and expression and activity of monodehydroascorbate reductases (MDHAR). No evidence was obtained that either GRs or MDHARs were upregulated in plants lacking DHAR function. Hence, interplay between different DHARs appears to be necessary to couple ascorbate and glutathione pools and to allow glutathione-related signaling during enhanced H₂O₂ metabolism.

ARTICLE HISTORY

Received 9 June 2017
Accepted 5 July 2017

KEYWORDS

Antioxidant; ascorbate; glutathione; glutathione S-transferase; hydrogen peroxide; oxidative stress; peroxiredoxin

Redox signaling linked to reactive oxygen species such as H₂O₂ has become accepted as an important player during plant development and responses to the environment.¹ Thiol modifications are thought to be among the predominant mechanisms by which redox signaling occurs, and are controlled by components such as thioredoxins, glutaredoxins, and glutathione.^{2–5} As the main non-protein thiol in cells, glutathione contributes to redox homeostasis and signaling under conditions of oxidative stress, when accumulation of the oxidized (disulfide) form (GSSG) is often observed.^{6,7} Oxidation of glutathione to GSSG has been for many years thought to be coupled to ascorbate peroxidase (APX) activity through the ascorbate-glutathione pathway,⁸ either through chemical reduction of dehydroascorbate (DHA) or through DHA reductases (DHAR). However, evidence that this occurs *in planta* is mainly circumstantial and work over more recent years has identified several types of peroxidases that can link glutathione oxidation to H₂O₂ more directly.⁹ These include glutathione S-transferases (GSTs), some of which can act as glutathione peroxidases,¹⁰

and certain types of peroxiredoxin (PRXII) that are coupled to glutathione oxidation via glutaredoxins.¹¹

We have used loss-of-function mutants to evaluate the contribution of candidate enzymes to glutathione oxidation, within the wider objectives of understanding the complexity of H₂O₂ metabolism in plants and its coupling to oxidative signaling. Because the formerly named glutathione peroxidases are now considered to use thioredoxins as a reductant,^{12,13} they are probably not major players in glutathione oxidation. Hence, we focused on available mutants for GSTs, PRXs and DHARs. These types of proteins are encoded, respectively, by about 50, 5, and 3 expressed genes in *Arabidopsis*. GSTs were originally considered to serve mainly in conjugation of endogenous and xenobiotic compounds detoxification until the discovery of their functions in preventing oxidative damage to cells.^{10,14,15} Stress-inducible GSTs with glutathione peroxidase activity can protect plants from oxidative injury, strengthening the idea that GSTs have peroxidatic functions in addition to catalyzing the formation of GSH conjugates.^{16,17} Such functions may contribute to accumulation in GSSG in conditions of stress.

CONTACT Graham Noctor  graham.noctor@u-psud.fr  IPS2, University of Paris sud, Bâtiment 630, Orsay, None 91405, France.

[†]Present address: Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, College of Life Science, Hubei University, 430062 Wuhan, China.

[‡]Present address: Department of Plant Systems Biology, VIB, and Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, 9052 Ghent, Belgium.

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

Commentary on: Rahantaniaina MS, Li S, Chatel-Innocenti G, Tuzet A, Issakidis-Bourguet E, Mhamdi A, Noctor G. Chloroplastic and cytosolic dehydroascorbate reductases co-operate in oxidative stress-driven activation of the salicylic acid pathway. *Plant Physiol.* 2017;174(2):956–971. doi: 10.1104/pp.17.00317.

© 2017 Taylor & Francis Group, LLC

Similarly, the glutaredoxins that regenerate type II PRX may oxidize GSH to GSSG.^{4,18}

There have been very few gene-specific studies of Arabidopsis GSTs and PRXs that have reported data on effects on tissue glutathione contents. Loss of *PRXIIIF* function slightly affected root glutathione pools in control conditions but during stress little difference from the wild-type was observed.¹⁹ We obtained T-DNA mutants for 2 type II PRX and 3 GSTs that are induced by oxidative stress⁹ (Supp. Fig. S1). RT-PCR analysis showed that the corresponding transcripts were absent in homozygotes (Supp. Fig. S2). We did not find effects of any of the mutations on rosette phenotype under optimal growth conditions (data not shown). To assess the roles of the candidate genes in GSSG accumulation triggered by oxidative stress, we

used 3-aminotriazole (3-AT) to inhibit catalase, because catalase deficiency causes a well-defined oxidative stress that leads to glutathione accumulation as GSSG.⁶ 3-AT decreased catalase to very low levels while inducing ascorbate peroxidase (APX) and DHAR activities (Supp. Fig. S3). These effects were accompanied by extensive leaf bleaching, and glutathione oxidation was evident as marked accumulation of GSSG (Fig. 1). No difference was observed in bleaching or glutathione contents between the wild-type control and any of the mutants (Fig. 1). Thus, while some of these genes, such as *GSTU24*, are strongly induced by oxidative stress,⁹ our initial analysis provides little evidence that any of them are indispensable players in conditions where increased H₂O₂ availability is driving GSSG accumulation. This could reflect redundancy between gene

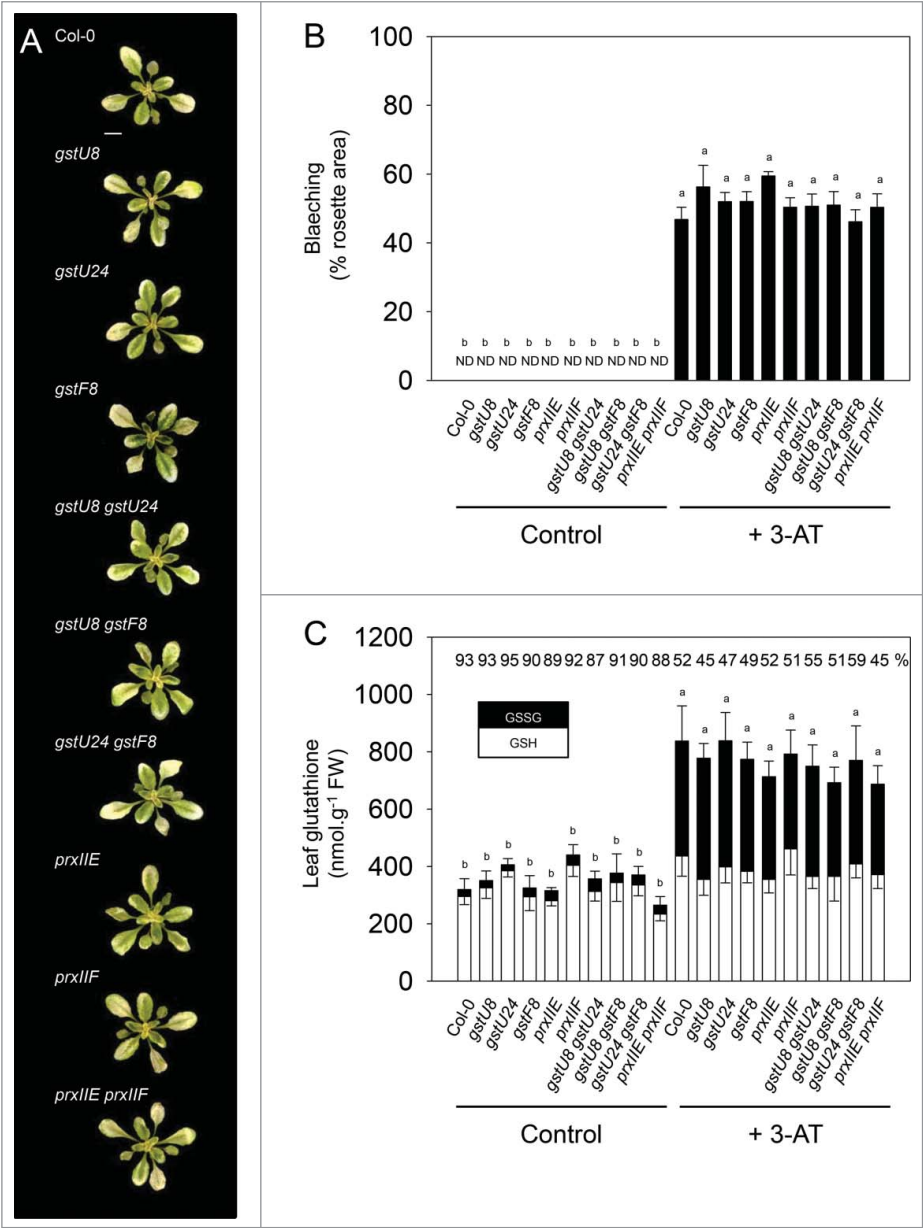


Figure 1. Effect of 3-AT treatment on Col-0, *gstU8*, *gstU24*, *gstF8*, *prxIIIE*, *prxIIIF*, *gstU8 gstU24*, *gstU8 gstF8*, *gstU24 gstF8* and *prxIIIE prxIIIF* phenotypes and leaf glutathione content. (A) Phenotype of plants 48 h after 3-aminotriazole (3-AT) treatment. Plants were grown at an irradiance of 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in a 16h photoperiod and treated with 2 mM 3-AT after 3 weeks. Bar indicates 1 cm. (B) Bleached areas in the different genotypes as a percentage of the total rosette area. ND, not detected. Values are means $\pm$ SE of 15 plants. Bleaching was quantified using IQmaterials software. (C) Leaf contents of glutathione, measured as described previously.²⁰ White bars, reduced form. Black bars, oxidized form. Numbers above each bar indicate percentage reduction states [$100 \times (\text{reduced form}/\text{total})$] and are means of 3 biological replicates. Letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

functions within a particular family. As a first step to verify this point, we produced 3 double mutants from the 3 GSTs and a *prxIIIE prxIIIF* line. Like the single mutants, no effects on bleaching or glutathione oxidation were observed.

Clearly, further work would be required to examine a wider variety of conditions and to explore possible redundancy before the GSTs and GRX-PRXII systems can be ruled out as significant routes for glutathione oxidation. Nevertheless, our analyses of loss-of-function mutants for DHAR suggest that ascorbate regeneration is the major route leading to GSSG accumulation in response to intracellular H_2O_2 .²⁰ A complete set of single, double and triple mutants carrying T-DNAs in DHAR1, DHAR2, and DHAR3 was obtained. No effect on phenotype was observed in the absence of stress. When the different *dhar* mutant combinations were introduced into a catalase-deficient background (*cat2*), the combined presence of *dhar1* and *dhar2* decreased GSSG and total glutathione accumulation (Fig. 2; Supp. Table S2). When all 3 DHARs were knocked out, *cat2*-triggered glutathione oxidation was almost completely inhibited (Fig. 2). Similar effects were observed in *dhar1 dhar2* and *dhar1 dhar2 dhar3* mutants using 3-AT to inhibit catalase in the same experimental conditions as those used for Fig. 1.²⁰ Interestingly, the effect on glutathione was not accompanied by significant effects on DHA or total ascorbate (Fig. 2; Supp. Table S2), suggesting that DHARs may be more important to ensure GSH

oxidation than to maintain low DHA. Indeed, the downregulation of GSSG accumulation was accompanied by suppression of *cat2*-triggered lesions (Fig. 2), which are dependent upon both salicylic acid and glutathione.^{21,22} This occurs even though H_2O_2 -inducible genes such as *APX1* and *GSTU24* are not affected or even increased by the triple loss of DHAR function in the catalase-deficient background (Fig. 2). The major contribution to both lesion formation and glutathione oxidation triggered by catalase deficiency appears to come from DHAR1 and DHAR2, which we found to be cytosolic, with a minor but significant contribution from chloroplastic DHAR3. A key role for the cytosol in oxidative stress responses triggered by catalase deficiency is consistent with other observations.^{7,23}

These observations and those we have recently reported elsewhere suggest that DHARs operate redundantly to ensure glutathione oxidation in response to intracellular H_2O_2 . This is somewhat surprising because even if glutathione oxidation were entirely DHA-dependent, some might still be expected to occur independently of DHARs through the rapid chemical reaction between GSH and DHA.^{8,24} Thus, it is possible that the decreased oxidation of glutathione when DHAR functions are lost is not a direct effect, but rather the result of secondary mechanisms. One possibility is that glutathione reductase (GR) is upregulated to keep glutathione more reduced. However, the triple *dhar1 dhar2 dhar3* mutant does not have a marked

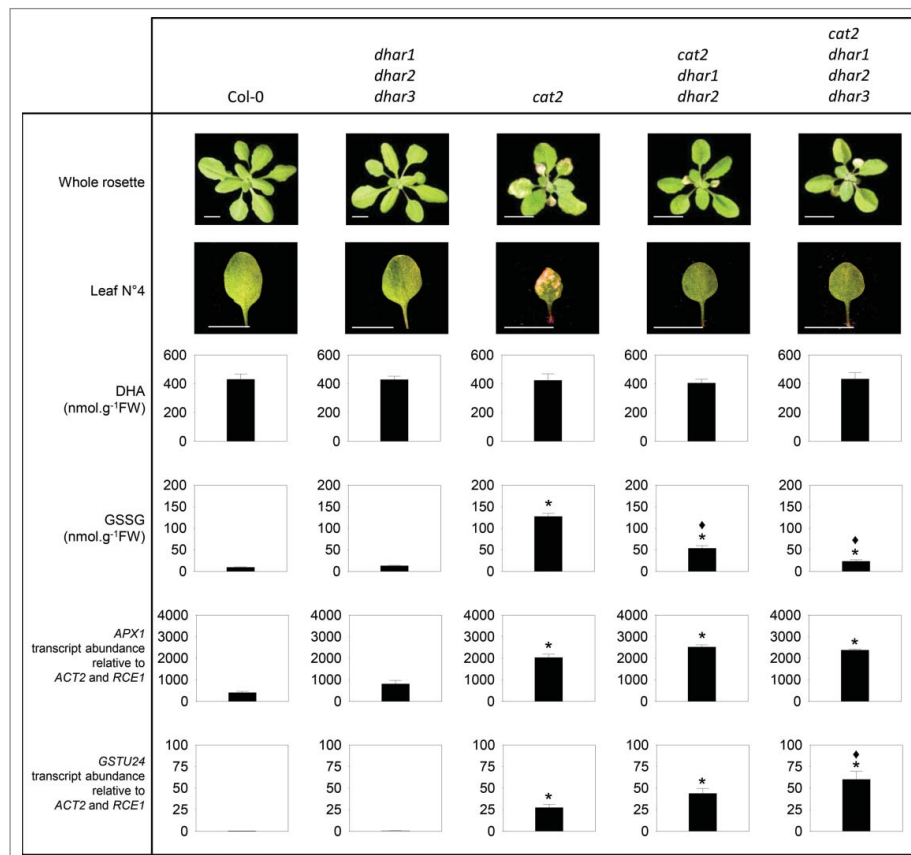


Figure 2. Phenotypes and accumulation of oxidants and oxidative stress marker transcripts implicate DHAR1 and DHAR2 as redundant players in glutathione oxidation in response to increased intracellular H_2O_2 . The 2 triple mutants *cat2 dhar1 dhar2*, *dhar1 dhar2 dhar3* and the quadruple mutant *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* were produced as described previously.²⁰ Plants were grown as in Fig. 1. Bars = 1 cm. Leaf contents of dehydroascorbate (DHA) and glutathione disulfide (GSSG) were measured as described previously. Values are means $\pm$ SE of 9 plants. *APX1* and *GSTU24* transcripts were quantified by qRT-PCR using 2 reference genes (*ACT2* and *RCE1*). Data are means $\pm$ SE of 3 biological replicates and have been multiplied by 100 for ease of expression. Significant difference between mutants and Col-0 at $P < 0.05$ is indicated by asterisks while diamonds indicates significant difference between *cat2* and triple and quadruple mutants in the *cat2* background.

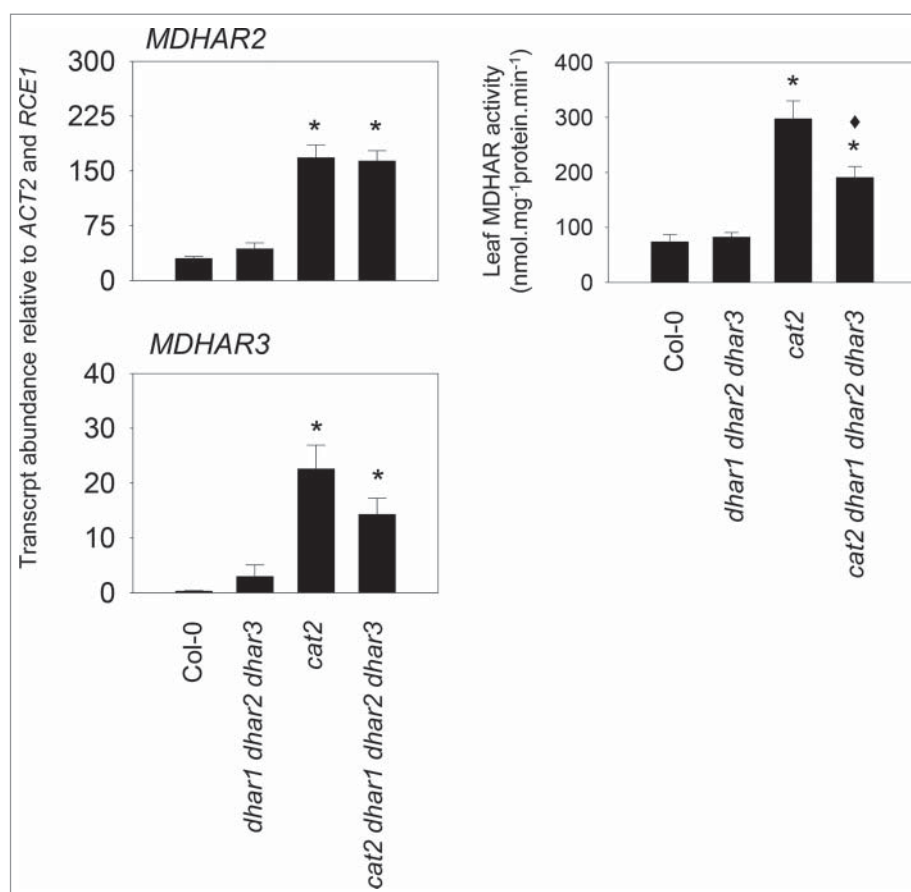


Figure 3. Expression of the 2 cytosolic isoforms Arabidopsis genes encoding monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and leaf MDHAR extractable activity in Col-0, *dhar*, and *cat2* mutants. For the transcript abundance, data are expressed relative to *ACT2* and *RCE1*, have been multiplied by 100 for ease of expression, and are means $\pm$ SE of 3 biological replicates from plants growing in conditions as described for Fig. 2. For MDHAR extractable activity, values are means $\pm$ SE of 4 plants. Significant difference between mutants and Col-0 at $P < 0.05$ is indicated by asterisks while diamonds indicates significant difference between *cat2* and the quadruple *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*.

increase in extractable GR, even in conditions of oxidative stress²⁰ and neither of the 2 Arabidopsis genes encoding this enzyme is upregulated in response to loss of DHAR function (Supp. Fig. S4). A second indirect mechanism could be marked upregulation of MDHAR activity, which could choke off supply of DHA produced during oxidative stress by competing with MDHA dismutation. Potentially, this could lead to lower accumulation of DHA and, thereby, lower accumulation of GSSG. MDHAR is encoded by 5 genes in Arabidopsis, 2 of which (*MDHAR2*, *MDHAR3*) give rise to cytosolic enzymes. As Fig. 3 shows, both these genes were markedly induced by oxidative stress in *cat2*, and this was accompanied by an increase in extractable MDHAR activity. No further increase in either expression or activity was detected in *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*. Indeed, MDHAR activity was somewhat lower in the quadruple mutant than in *cat2* (Fig. 3).

Our observations provide further evidence that the ascorbate-glutathione pathway is a major player in removing intracellular H_2O_2 , and identify key overlapping roles for DHAR in ensuring glutathione oxidation in these conditions. Other recent studies of single *dhar* mutants have also reported significant changes in glutathione oxidation during stress conditions.^{25,26} Results shown here and elsewhere²⁰ underscore the role of DHARs in coupling H_2O_2 to glutathione oxidation during signaling while at the same time raising perspectives for further work. Questions notably

include whether DHA is indeed the major physiological oxidant used by all 3 DHARs and the nature of the intracellular traffic that functionally links chloroplastic DHAR3 with cytosolic DHAR1 and DHAR2 during H_2O_2 -triggered oxidation of glutathione.²⁰

Acknowledgments

We are grateful to the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory for providing the sequence-indexed Arabidopsis T-DNA insertion mutants and to the Nottingham Arabidopsis Stock Center (UK) for supply of seed stocks. M.-S.R. wishes to thank the Doctoral School ED129 “Sciences de l’Environnement d’Île de France” for the kind award of a Bourse Ministérielle (PhD studentship). G.N. thanks the ANR (France) for financial support through the “Cynthiol” research program (grant no. ANR12-BSV6-0011).

References

1. Dietz KJ, Mittler R, Noctor G. Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. *Plant Physiol.* 2016;171:1535–1539. doi:10.1104/pp.16.00938.
2. Lemaire SD, Michelet L, Zaffagnini M, Massot V, Issakidis-Bourguet E. Thioredoxins in chloroplasts. *Curr Genet.* 2007;51:343–365. doi:10.1007/s00294-007-0128-z.
3. Meyer Y, Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld JP, Riondet C. Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17:1124–1160. doi:10.1089/ars.2011.4327.

4. Rouhier N. Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulfur centre assembly. *New Phytol.* 2010;186:365–372. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03146.x.
5. Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* 2012;35:454–484. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x.
6. Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G. Catalase in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot.* 2010a;61:4197–4220. doi:10.1093/jxb/erq282
7. Mhamdi A, Hager J, Chaouch S, Queval G, Han Y, Taconnat Y, Saindrenan P, Gouia H, Issakidis-Bourguet E, Renou JP, et al. Arabidopsis GLUTATHIONE REDUCTASE 1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular H₂O₂ and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol.* 2010b;153:1144–1160. doi:10.1104/pp.110.153767
8. Foyer CH, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta.* 1976;133:21–25. doi:10.1007/BF00386001.
9. Rahantaniaina MS, Tuzet A, Mhamdi A, Noctor G. Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: How is glutathione oxidized in plants? *Front Plant Sci.* 2013;4:477. doi:10.3389/fpls.2013.00477.
10. Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ, Edwards R. Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *J Exp Bot.* 2009;60:1207–1218. doi:10.1093/jxb/ern365.
11. Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP. Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J Biol Chem.* 2002;277:13609–13614. doi:10.1074/jbc.M111489200.
12. Iqbal A, Yabuta Y, Takeda T, Nakano Y, Shigeoka S. Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* 2006;273:5589–5597. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05548.x.
13. Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP, Rouhier N. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* 2006;142:1364–1379. doi:10.1104/pp.106.089458.
14. Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 2000;123:1561–1570. doi:10.1104/pp.123.4.1561.
15. Kampranis SC, Damianova R, Atallah M, Toby G, Kondi G, Tsichlis PN, Makris AM. A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. *J Biol Chem.* 2000;275:29207–29216. doi:10.1074/jbc.M002359200.
16. Roxas VP, Smith RK, Allen ER, Allen RD. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat Biotechnol.* 1997;15:988–991. doi:10.1038/nbt1097-988.
17. Cummins I, Cole DJ, Edwards R. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J.* 1999;18:285–292. doi:10.1046/j.1365-3113.1999.00452.x.
18. Bréhélin C, Meyer EH, de Souris JP, Bonnard G, Meyer Y. Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins: similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. *Plant Physiol.* 2003;132:2045–2057. doi:10.1104/pp.103.022533.
19. Finkemeier I, Goodman M, Lamkemeyer P, Kandlbinder A, Sweetlove LJ, Dietz KJ. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of Arabidopsis thaliana under stress. *J Biol Chem.* 2005;280:12168–12180. doi:10.1074/jbc.M413189200.
20. Rahantaniaina MS, Li S, Chatel-Innocenti G, Tuzet A, Issakidis-Bourguet E, Mhamdi A, Noctor G. Cytosolic and chloroplastic DHARs cooperate in oxidative stress-driven activation of the salicylic acid pathway. *Plant Physiol.* 2017;174(2):956–971. Apr 5. pii: pp.00317.2017. doi:10.1104/pp.17.00317.
21. Chaouch S, Queval G, Vanderauwera S, Mhamdi A, Vandenborgh M, Langlois-Meurinne M, Van Breusegem F, Saindrenan P, Noctor G. Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 in a daylength-related manner. *Plant Physiol.* 2010;153:1692–1705. doi:10.1104/pp.110.153957.
22. Han Y, Chaouch S, Mhamdi A, Queval G, Zechmann B, Noctor G. Functional analysis of arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H₂O₂ to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18:2106–2121. doi:10.1089/ars.2012.5052.
23. Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, van de Cotte B, Morsa S, Ravanat JL, Hegie A, Triantaphylides C, Shulaev V, Van Montagu MC, et al. Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:1711–1716. doi:10.1073/pnas.1018359108.
24. Polle A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 2001;126:445–462. doi:10.1104/pp.126.1.445.
25. Noshi M, Hatanaka R, Tanabe N, Terai Y, Maruta T, Shigeoka S. Redox regulation of ascorbate and glutathione by a chloroplastic dehydroascorbate reductase is required for high-light stress tolerance in Arabidopsis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016;80:870–877. doi:10.1080/09168451.2015.1135042.
26. Noshi M, Yamada H, Hatanaka R, Tanabe N, Tamoi M, Shigeoka S. Arabidopsis dehydroascorbate reductase 1 and 2 modulate redox states of ascorbate-glutathione cycle in the cytosol in response to photooxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017;81:523–533. doi:10.1080/09168451.2016.1256759.

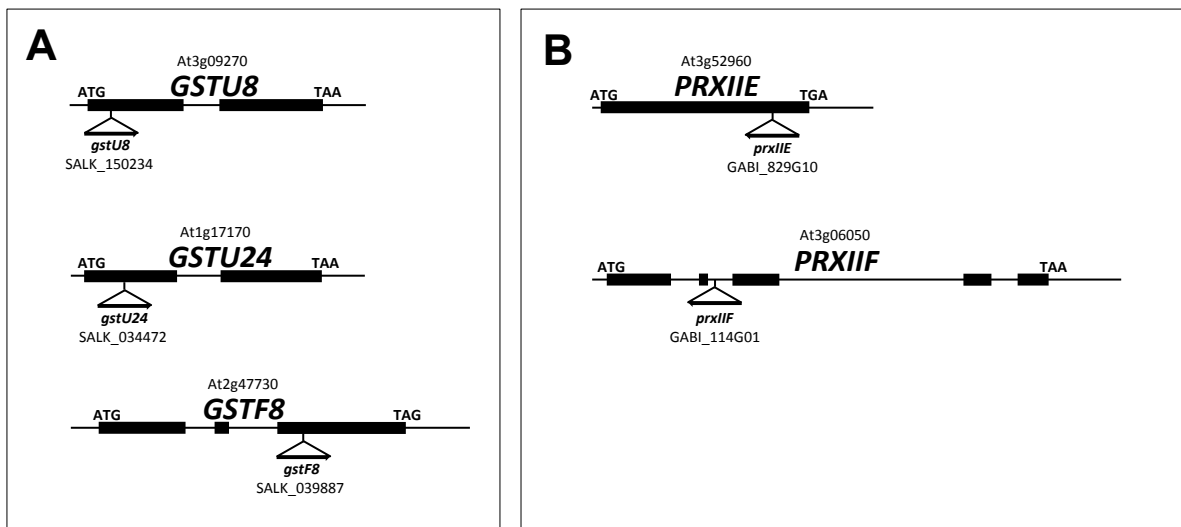
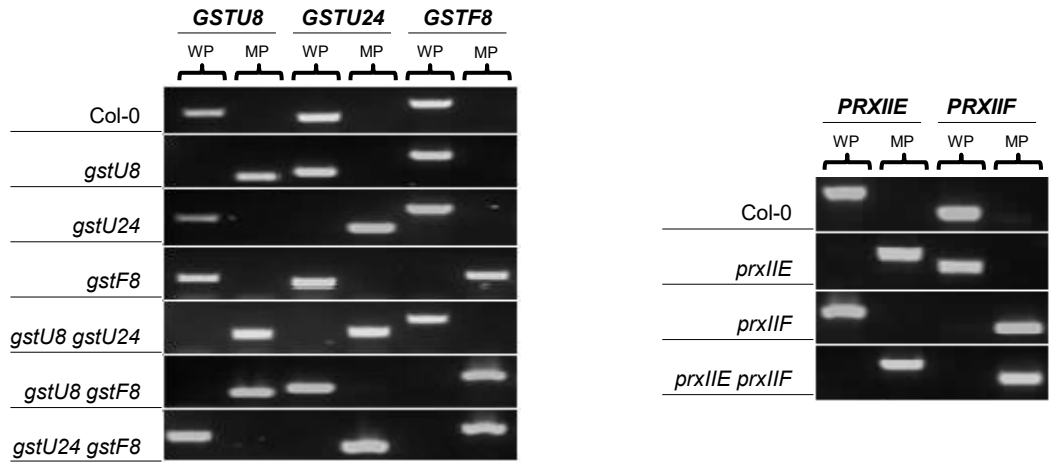


Figure S1. Schematic diagram of T-DNA insertion in Arabidopsis *gst* (A) and *prx* (B) mutants.

Exons and introns are depicted to scale by boxes and lines, respectively. The coding region of the gene is shown as black boxes. The position of the T-DNA is indicated by the triangle and the arrow indicates the direction of the T-DNA insertion.

Seeds of Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) mutants in the ecotype Columbia (Col-0) background were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center (<http://nasc.nott.ac.uk>).

A PCR with genomic DNA



B RT-PCR

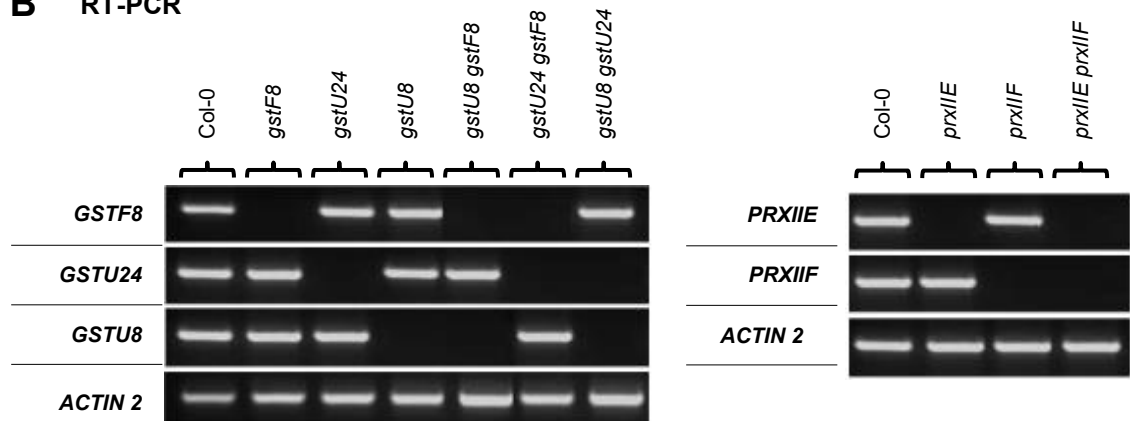


Figure S2. Genotyping and expression analysis of *gst* and *prx* mutants.

(A) PCR analysis of homozygous single *gstU8*, *gstU24*, and *gstF8* (gels shown in the left) *prxIIIE* and *prxIIIF* (gels shown in the right) T-DNA mutants and after crossing to produce double mutants *gstU8 gstU24*, *gstU8 gstF8*, *gstU24 gstF8* in the left and *prxIIIE prxIIIF* in the right. For each gene, column 1 indicates primer combinations to amplify the wild-type gene (WP) and column 2 primer combinations to amplify gene-specific fragments using a T-DNA-specific primer (MP).

(B) RT-PCR analysis of *GSTU8*, *GSTU24*, *GSTF8*, *PRXIIE* and *PRXIIF* gene expression in wild-type (Col-0), homozygous *gstU8*, *gstU24*, *gstF8*, *prxIIIE* or *prxIIIF* single knockout mutant and the *gstU8 gstF8*, *gstU24 gstF8*, *gstU8 gstU24* and *prxIIIE prxIIIF* double mutants. Total RNA was isolated from the rosette leaves of 21-day old plants. Expression of *ACTIN2* was analyzed as a control. Names of mutant lines are given at the top.

All primer combinations are given in Supplemental Table S1.

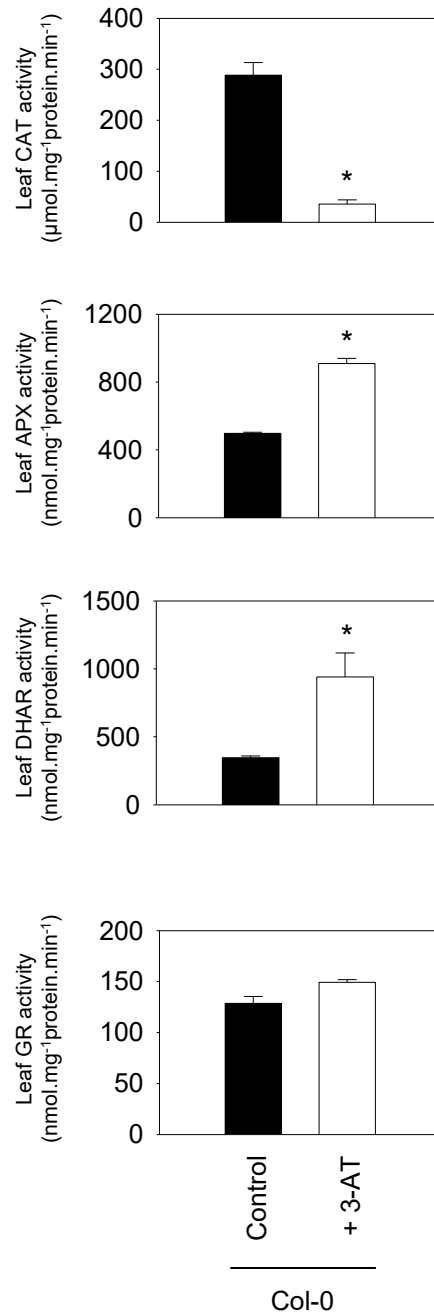


Figure S3. Major antioxidative enzyme activities in Col-0 after 48h of 3-AT treatment.

Extractable leaf activities of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR) and glutathione reductase (GR) after three weeks growth at an irradiance of $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in a 16h photoperiod. Black bars, control. White bars, 48h treated with 3-AT. Values are means $\pm$ SE of 3 plants. Asterisks indicate a significant difference between treated and untreated Col-0 at $P < 0.05$.

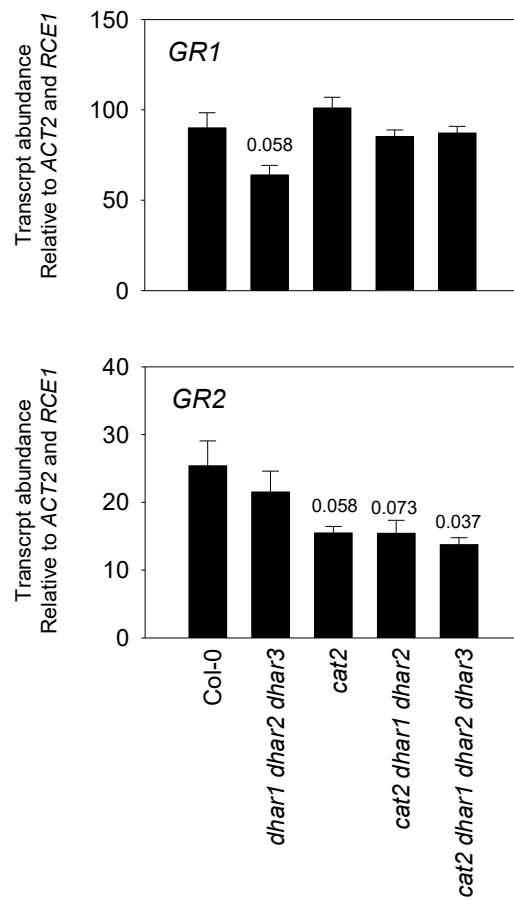


Figure S4. Expression of the two Arabidopsis genes encoding glutathione reductase (GR) in Col-0, *dhar*, and *cat2* mutants.

Data are expressed relative to *ACT2* and *RCE1*, have been multiplied by 100 for ease of expression, and are means $\pm$ SE of three biological replicates from plants growing on conditions as described for Figure 3. Statistical significance was evaluated using Student's t test: *P* values below 0.1 are indicated above relevant bars.

Supplementary Table S1. DNA primer sequences used in this study.

Oligonucleotide	Sequence	Technique
For_GSTU8	5'-AAGAACAGGCCTTCAACCAC-3'	Genotyping
Rev_GSTU8	5'-TTGAGGCAAGATCGTGTGAG-3'	Genotyping
For_GSTU24	5'-TCTTCTGGATTTCTGGGCGAG-3'	Genotyping
Rev_GSTU24	5'-CTCGCCGTAAACATTACCTG-3'	Genotyping
For_GSTF8	5'-ACGGTGATTTGACGCTTTTC-3'	Genotyping
Rev_GSTF8	5'-TCGTTTATTTGGGCAAAAGG-3'	Genotyping
ForPrxIIe	5'-CAAGCTCCCAGACTCCACTC-3'	Genotyping
Rev_PrxIIe	5'-TTTCACAACACCATCATCAGC-3'	Genotyping
For_PrxIIF	5'-CTAAGATCGGCGGCAAATAG-3'	Genotyping
Rev_PrxIIF	5'-TGCTGCTGTGAACAAACTCC-3'	Genotyping
Lb1	5'-TGGACCGCTTGCTGCAACTCTC-3'	Genotyping
LB_Gabi	5'-CCATATTGACCATCATACTATTGC-3'	Genotyping
ForActin2	5'-TTCCCTCAGCACATTCCAGCAG-3'	RT-PCR
RevActin2	5'-TTAACATTGCAAAGAGTTTCAAGG-3'	RT-PCR
For_GSTU8	5'-GAGCACGTAAAGCTTCTGGG-3'	RT-PCR
Rev_GSTU8	5'-CACGAAATCTCCGACCAAC-3'	RT-PCR
For_GSTU24	5'-GGGATGAGGACAAGAATTGC-3'	RT-PCR
Rev_GSTU24	5'-TAGCGACGCTCTCTCTCTCC-3'	RT-PCR
For_GSTF8	5'-TCAAGCTCGTCTTCCCTTGT-3'	RT-PCR
Rev_GSTF8	5'-GGTTGCCTTGACTTTCTTGC-3'	RT-PCR
For_PrxIIe	5'-AAGCTCCCAGACTCCACTCTC-3'	RT-PCR
Rev_PrxIIe	5'-TCAGAGAACCCGACTTCGAT-3'	RT-PCR
For_PrxIIF	5'-TTATCGGCACTAAGATCGGC-3'	RT-PCR
Rev_PrxIIF	5'-GCCTTAACCTTCCCGTCTTC-3'	RT-PCR
For_Actin2	5'-CTGTACGGTAACATTGTGCTCAG-3'	RT-qPCR
Rev_Actin2	5'-CCGATCCAGACACTGTACTTCC-3'	RT-qPCR
For_RCE1	5'-CTGTTACGGAACCCAATTC-3'	RT-qPCR
Rev_RCE1	5'-GGAAAAAGGTCTGACCGACA-3'	RT-qPCR
For_APX1	5'-GCACTATTGGACGACCCTGT-3'	RT-qPCR
Rev_APX1	5'-GCAAACCCAAGCTCAGAAAG-3'	RT-qPCR
For_GR1	5'-TGGACGCCAGGAAAAGAC-3'	RT-qPCR
Rev_GR1	5'-TTGGTTGCTCCACACTTGAG-3'	RT-qPCR
For_GR2	5'-CCACACACTGTTGATGTAGATGG-3'	RT-qPCR
Rev_GR2	5'-GCTTGGAAGGCAAATCAAGC-3'	RT-qPCR
For_GSTU24	5'-TCCATAGCTGGTTTGCAGTG-3'	RT-qPCR
Rev_GSTU24	5'-TAGCGACGCTCTCTCTCTCC-3'	RT-qPCR
For_UGT73B3	5'-CCTCACCACACCTCTCAACTC-3'	RT-qPCR
Rev_UGT73B3	5'-TCTGGTAACCCGAGATCCAC-3'	RT-qPCR
For_MDHAR1	5'-ATCTGAGTGAACACAACCACC-3'	RT-qPCR
Rev_MDHAR1	5'-GGGTTTCCTCTGCCGTAGAC-3'	RT-qPCR
For_MDHAR2	5'-CGAGCACAACCTTCTGTTGAG-3'	RT-qPCR
Rev_MDHAR2	5'-GCCACTCTGAACTCAAAGCTC-3'	RT-qPCR
For_MDHAR3	5'-TAAAGTGGCAGCAGCACAAAC-3'	RT-qPCR
Rev_MDHAR3	5'-CTATAGAACTTGGTGGCGAAAG-3'	RT-qPCR
For_MDHAR4	5'-GAGACGCCGTAGATGGTGAG-3'	RT-qPCR
Rev_MDHAR4	5'-CCCACCAATGCTACAAACAAC-3'	RT-qPCR
For_MDHAR6	5'-GATTGCTCAAGCCGCTCTAC-3'	RT-qPCR
Rev_MDHAR6	5'-AGATGAATAACTCTCACCGGG-3'	RT-qPCR

Supplementary Table S2. Total ascorbate and glutathione in Col-0, *dhar1 dhar2 dhar3*, *cat2*, *cat2 dhar1 dhar2* and *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*.

Data are in nmol.g⁻¹ FW and are means of nine biological replicates.

*Indicates significant difference compared to Col-0. + Indicates significant difference of *cat2 dhar* mutants compared to *cat2*.

	Ascorbate	Glutathione
Col-0	3110 ± 105	356 ± 9
<i>dhar1 dhar2 dhar3</i>	3247 ± 157	315 ± 23
<i>cat2</i>	3307 ± 139	690 ± 31 *
<i>cat2 dhar1 dhar2</i>	3294 ± 108	561 ± 47 */+
<i>cat2 dhar1 dhar2 dhar3</i>	3283 ± 116	427 ± 24 */+

II.3.2. Discussion et Transition 3

En complément des résultats obtenus dans la **Sous-partie II.2** précédente, nous avons étudié la réponse et l'importance fonctionnelle des glutathion S-transférases (GST) et des peroxiredoxines glutarédoxine-dépendantes (PRXII-GRX) dans l'oxydation du glutathion.

Les résultats ont révélé que l'absence des gènes de GST candidats sélectionnés d'après les analyses présentées dans l'**Article 1**, à savoir *GSTU8*, *GSTU24* et *GSTF8*, n'a pas d'effet sur le statut du glutathion dans les feuilles. C'est ce que nous avons constaté, aussi bien en conditions normales de croissance qu'en situation de stress oxydant provoqué par la pulvérisation de 3-AT sur les feuilles des mutants simples *gstU8*, *gstU24*, *gstF8*, comme doubles : *gstU8 gstU24*, *gstU8 gstF8*, *gstU24 gstF8*, par comparaison au type sauvage. Les mêmes constats ont été faits suite à l'analyse des mutants *prxII*, *prxIIE* et *prxIIF*, simples ou double mutant. Aucune des lignées mutantes n'a présenté de phénotype particulier dans des conditions optimales ou oxydantes de croissance. Ces résultats peuvent être interprétés de différentes manières. (1) Les autres voies qui peuvent oxyder le glutathion sont beaucoup plus efficaces dans la feuille, en tout cas au stade de développement que nous avons analysé, on pense, bien sûre, à la voie ascorbate-glutathion que nous avons analysée dans l'**Article 2**. (2) Des voies de compensation se mettent en route, ou sont favorisées, en l'absence des gènes mutés. (3) Enfin, les deux familles des GSTs et des PRXsII chez *Arabidopsis* étant multigéniques, une redondance fonctionnelle entre plusieurs isoformes est fortement probable. En l'état actuel de nos connaissances, on ne peut pas considérer que les voies d'oxydation du glutathion médiées par certaines GSTs et PRXs jouent un rôle important et irremplaçable dans l'oxydation du GSH en condition optimale de culture ou en situation de stress oxydant en réponse au traitement par le 3-AT.

Au cours de cette étude, nous avons également analysé les mutants des DHARs (présentés dans l'**Article 2**). Comme dans le fond génétique *cat2* (**Article2**), la perte multiple de fonctions DHAR diminue nettement l'oxydation du glutathion déclenchée par un traitement au 3-AT. Les nouveaux résultats obtenus permettent de préciser que si l'oxydation du glutathion a presque disparu en l'absence des DHARs ce n'est pas grâce à une compensation au niveau de la MDHAR, ni de la GR. En effet, chez le quadruple mutant *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*, nous n'avons mesuré aucune induction de l'expression des gènes de MDHAR et de GR et les dosages de l'activité extractible de ces deux enzymes n'ont pas montré d'augmentation. Par conséquent, l'interaction entre les différentes DHARs semble être nécessaire pour coupler les pools d'ascorbate et de glutathion et pour permettre la signalisation liée au glutathion au cours du métabolisme de l'H₂O₂.

Forts de l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail de thèse et des données de la littérature, afin d'intégrer au mieux toute la complexité du métabolisme du H₂O₂ chez les plantes, nous avons développé par la suite, une autre approche, celle de la modélisation mathématique. Nous avons élaboré un modèle mécaniste afin de comprendre, d'un point de vue théorique, les mécanismes impliqués dans le contrôle du stress oxydant chez la plante face aux contraintes environnementales.

II. Résultats

II.4. Modélisation de la production et du métabolisme du H_2O_2 en conditions de croissance optimales et stressantes

II.4.1. Préambule 4

Dans cette dernière Sous-partie de la partie résultats, nous avons élaboré un modèle de compréhension théorique du mécanisme du stress oxydant dans la cellule de la plante face aux contraintes environnementales. En complément des approches expérimentales et présentées dans les trois **Sous-parties II.1-II.3** précédentes, modéliser le vivant permet de traiter plusieurs informations, telles que les différentes voies métaboliques impliquées dans le stress oxydant.

Notre objectif est de proposer un modèle nous permettant de mieux comprendre les divers mécanismes impliqués dans le stress oxydant et leurs interactions. En effet, comprendre le mécanisme du stress oxydant, du moins les voies les plus importantes dans le contrôle de ce stress, peut permettre, à terme, de manipuler les mécanismes par lesquels les plantes font face aux fluctuations environnementales, et donc, d'améliorer leurs performances aux champs mais aussi de guider les décisions politiques concernant le changement climatique. En effet, par exemple, les modèles de prédiction de seuil d'exposition des végétaux aux polluants peuvent guider le gouvernement et les pouvoirs publics pour mieux anticiper leurs prises de décision visant à limiter l'accroissement des polluants tel que l'ozone troposphérique. En comprenant mieux comment la plante réagit face au contexte actuel du réchauffement climatique et les variantes variétales, on pourrait faciliter le choix de la variété la plus adaptée à l'agriculture du futur grâce aux modèles de sélection variétale. La modélisation des mécanismes impliqués dans le stress oxydant peut aider à trouver des solutions efficaces pour pallier les pertes de rendements en agriculture liés au changement climatique mais également pour nourrir la population mondiale grandissante d'aujourd'hui et de demain.

Nous avons développé un modèle qui tient compte de la production et du métabolisme du H_2O_2 à l'échelle fine de la cellule de la plante. Ce modèle est basé sur les études sur le mutant conditionnel *cat2*. Nous avons vu que les contraintes environnementales sont nombreuses et diverses, elles peuvent être aussi bien biotiques qu'abiotiques (voir la **Partie I**). Dans la nature, les plantes sont soumises à des conditions fluctuantes, difficiles à modéliser compte tenu du nombre élevé de paramètres qu'il faudrait prendre en compte. A l'inverse, le mutant *cat2* est un système inductible, reproductible et contrôlable, il s'est imposé comme modèle d'étude adapté à ce travail. De plus, comme nous l'avons vu, le stress intracellulaire engendré chez ce mutant mime un tronc de signalisation commun à de nombreuses réponses à différents stress tels que l'exposition à l'ozone ou encore l'attaque des organismes pathogènes (Chaouch et al., 2010 ; Dghim et al., 2013 ; Han et al., 2013a).

Notre modèle tient compte d'une production à prédominance photorespiratoire du H_2O_2 , typique des plantes de type C3 en situation de stress (Noctor et al., 2002) et qui est la cause des ajustements redox observés chez le mutant *cat2* (Smith et al., 1984 ; Willekens et al., 1997 ; Queval et al., 2007). Cette production d' H_2O_2 , nous l'avons modélisée de sorte qu'elle soit photopériode et intensité lumineuse dépendantes, comme c'est le cas dans les plantes. Puis nous avons modélisé la cinétique expérimentale des catalases et chacune des enzymes de la voie ascorbate-glutathion. Voulant intégrer au modèle l'implication majeure du glutathion dans l'homéostasie redox de la cellule, nous avons également tenu compte de la régulation de sa synthèse, la séquestration de sa forme oxydée dans la vacuole, et les différentes voies de production du NADPH nécessaire pour le fonctionnement de

la voie ascorbate-glutathion. L'élaboration de ce modèle a nécessité de rassembler, à partir de la littérature et de mes résultats expérimentaux, tous les paramètres nécessaires afin de réaliser les analyses de sensibilité.

Dans le cadre de cette étude, j'ai donc dû approfondir les mesures d'ascorbate et de glutathion chez Col-0 et le mutant *cat2* rapportées dans les **Sous-parties** des résultats **II.2 et II.3**. Pour cela, une cinétique détaillée a été réalisée sur quatre cycles jour-nuit consécutifs. Les données générées dans ces analyses ont servi de contraintes pour configurer le modèle. A partir des analyses de sensibilité on identifie la paramétrisation permettant de reproduire dans le modèle les réponses, observées chez les plantes : (1) les pools d'ascorbate et de glutathion qui restent fortement réduits lorsque la catalase est active (correspondant à la situation Col-0) ; (2) un pool d'ascorbate qui reste également dans un état fortement réduit lorsque la catalase est absente (approximation de la situation *cat2*) , et (3) une accumulation du glutathion, principalement sous la forme GSSG, lorsque la catalase est absente (simulation de la situation *cat2*). Dans cette **Sous-partie**, ce modèle est présenté sous la forme d'un article soumis pour publication.

ARTICLE 4

Analyzing the function of catalase and the ascorbate-glutathione pathway in H_2O_2 processing: Insights from an experimentally constrained kinetic model

Rahantaniaina MS, Tuzet A, Noctor G

Manuscript soumis à la revue

Antioxidants & Redox Signaling

Analyzing the function of catalase and the ascorbate-glutathione pathway in H₂O₂ processing: Insights from an experimentally constrained kinetic model

Marie-Sylviane Rahantaniaina^{1,2a}, Andrée Tuzet^{2a}, Graham Noctor^{1b}

¹Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), UMR 9213/UMR1403, Université Paris-Sud, CNRS, INRA, Université d'Evry, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Bâtiment 630, 91405 Orsay, France

²Unité Mixte de Recherche ECOSYS / Pôle BIOCLIMATOLOGIE, INRA – AgroParisTech, Route de la Ferme, F-78850 Thiverval-Grignon, France

^aThese authors have contributed equally to the work described in this manuscript.

^bCorrespondence: graham.noctor@u-psud.fr

Statistics

Abstract: 200 words

Main text (excluding reference and figure legends): 9172

Number of references: 162

Number of Figures: 9

Number of tables: 2

Abstract

Plant stress involves redox signaling linked to reactive oxygen species such as H_2O_2 , which can be generated at high rates in photosynthetic cells. The systems that process H_2O_2 include catalase and the ascorbate-glutathione pathway, but interactions between them remain unclear. Modelling can aid interpretation and pinpoint areas for investigation. Here, we introduce a new kinetic model to analyze interactions between photosynthetically produced H_2O_2 , catalase, ascorbate, glutathione and NADPH. The sensitivity points required for accurate simulation of experimental observations are analyzed, and the implications for H_2O_2 -linked redox signaling are discussed. The implications include: (i) catalase and ascorbate peroxidase can share the load in H_2O_2 processing even in optimal conditions; (ii) intracellular H_2O_2 concentrations above the low μM range may rarely occur; (iii) ascorbate redox turnover is largely independent of glutathione until ascorbate peroxidation exceeds a certain value; (iv) NADPH availability may determine glutathione oxidation through its influence on monodehydroascorbate reduction; and (v) the sensitivity of glutathione status to oxidative stress further emphasizes its potential suitability as a sensor of increased H_2O_2 . We discuss these and other issues as well as the current obstacles to their fuller understanding within the context of the model outputs and some of the available literature data.

Contents

Introduction.....	4
H ₂ O ₂ and plant antioxidative systems	4
Insight from studies of mutants	6
Response of glutathione to increases in intracellular H ₂ O ₂	6
Models of ROS processing in plants	7
Simulating photorespiratory H ₂ O ₂ production, metabolism and accumulation.....	8
Catalase and the ascorbate-glutathione system in the control of H ₂ O ₂ accumulation	9
Simulating ascorbate and glutathione responses to H ₂ O ₂	11
Pathways of glutathione oxidation and light-dependent regulation of ascorbate synthesis.....	12
Impact of H ₂ O ₂ processing on the modelled glutathione redox potential.....	13
Regulation of glutathione synthesis	14
The key role of MDHAR in determining glutathione oxidation	15
Low NADPH triggers glutathione oxidation by limiting MDHAR but not GR.....	16
NADPH-generating dehydrogenases and the ascorbate-glutathione pathway	17
Concluding remarks and perspectives	19

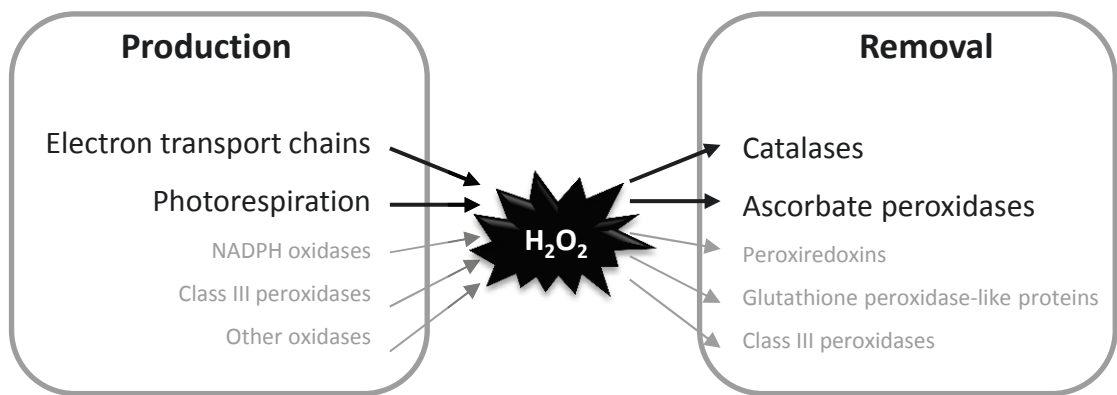


FIG. 1. Major pathways for production and removal of H_2O_2 (hydrogen peroxide) in plants. The processes considered in the model are shown in large type.

Introduction

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is one of the most stable of the reactive oxygen species (ROS) that are important players in determining plant cell redox state and signaling (2,19,93). This key oxidant is chiefly generated by reduction and protonation of the superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) or by direct reduction of O_2 , catalyzed by certain oxidases. Multiple sources of H_2O_2 exist in different plant cell compartments (100). These notably include electron leakage to O_2 from the electron transport chains in chloroplasts and mitochondria, in which H_2O_2 is formed secondarily from superoxide. Other routes of H_2O_2 production via superoxide include respiratory burst oxidase homolog (RBOH)-type enzymes that are important players in developmental and stress responses (30,37,140,142). Among oxidases that directly produce H_2O_2 from O_2 , the peroxisomal glycolate oxidase reaction can be particularly rapid in plants, because it is driven by high rates of glycolate produced in photorespiration (105). Other sources include amine oxidases and fatty acid oxidases.

Although relatively stable compared to other ROS, H_2O_2 has a strong oxidizing potential and can oxidize cellular thiols, including specific protein cysteines to form sulfenic acid groups (44). It can become more generally reactive if transformed into the hydroxyl radical ($\text{OH}^{\cdot}$), an extremely unstable molecule that reacts very rapidly with a wide variety of biological molecules (46). Although H_2O_2 is produced by plant cells at quite high rates in optimal environmental conditions, it is generated even faster in plants under stress conditions like air pollution, intense light, drought, or pathogen attack. While this can lead to a condition known as oxidative stress, it can also be perceived as a signal that allows the plant to acclimate to the new external conditions (2,93,146). Due to its relatively long lifespan (about 1 ms), H_2O_2 can traverse cellular membranes and migrate to different compartments through aquaporins that facilitate its signaling functions (6). To avoid oxidative stress and to achieve appropriate ROS signaling responses, the plant cell contains elaborate antioxidative systems, many of which function to limit the accumulation of H_2O_2 .

H_2O_2 and plant antioxidative systems

The role of H_2O_2 in signaling in plants is dependent on the balance between its production and removal (Fig. 1), with several types of antioxidative enzymes acting on H_2O_2 to keep concentrations low enough to be compatible with continued cell function (34,93). Among H_2O_2 -scavenging enzymes, catalases (CAT) have the highest capacity and are some of the most rapid enzymes known. They do not require cellular reductants as they primarily catalyze a dismutase reaction and, in most organisms, are located mainly in the peroxisomes (90,155,160). As well as catalases, the best described route for H_2O_2 metabolism is the ascorbate-glutathione pathway, which is considered to consist of a network of reactions involving several enzymes. H_2O_2 is reduced to water by ascorbate peroxidase (APX), producing monodehydroascorbate radicals (MDHA). MDHA can be reduced back to ascorbate by ferredoxin (95) or by NAD(P)H in a reaction catalyzed by MDHA reductase (MDHAR; 55). MDHA that escapes these reactions can spontaneously disproportionate to ascorbate and dehydroascorbate (DHA). Because DHA is probably the main route for ascorbate degradation, it must be recycled to avoid depletion of ascorbate pools (109,110,132). While several cellular factors can reduce DHA, GSH is considered to be a major player, acting either nonenzymatically or via an enzymatic reaction catalyzed

by DHA reductase (DHAR; 31,32). Consumption of GSH to regenerate ascorbate involves production of glutathione disulfide (GSSG), the major oxidized form of glutathione. Recycling of GSH from GSSG is achieved by glutathione reductase (GR) with consumption of NADPH. Therefore, unlike catalases, the ascorbate-glutathione pathway consumes cellular reductants such as NAD(P)H in two reactions (MDHAR and GR). The pathway is found in several subcellular compartments, including chloroplasts, mitochondria and peroxisomes, and the cytosol (15,60).

In addition to these two relatively well-characterized routes, other possibilities exist for removal of H_2O_2 in plants. Perhaps the most important additional players are peroxiredoxins (PRX), which are composed of several types that use reductants such as thioredoxins (TRX), glutathione-linked glutaredoxins (GRX), and ascorbate (21,141). In terms of cellular reductant, these enzymes will, like the ascorbate-glutathione pathway, ultimately depend on reduced ferredoxin or NAD(P)H. In animals, glutathione peroxidases play roles in H_2O_2 metabolism. While glutathione peroxidase-like proteins (GPXL) exist in plants, they are likely to function similarly to some PRX in using TRX, rather than GSH (56,99). Both PRX and GPXL are located in several cellular compartments (3,141). In addition to APX, PRX and GPXL, another contribution to H_2O_2 removal could come from heme-based class III peroxidases, which are encoded by a large number of genes in plants but whose precise contribution to H_2O_2 processing is not entirely clear (107). At least under some conditions, these peroxidases may contribute to H_2O_2 production rather than removal (108).

Insight from studies of mutants

The above discussion highlights the complexity of H_2O_2 -metabolizing systems in plants, especially when one considers the accessory enzymes that are involved in generating reductants such as NADPH to support these systems. The lack of phenotype observed in specific loss-of-function mutants for some of these enzymes points to redundancy due to functional overlap (87,117,118). However, certain enzymes involved in peroxide metabolism have been shown to be important to support plant growth in either optimal or stress conditions. It is outside the scope of the present text to provide an exhaustive list of these studies, but important roles identified in studies in *Arabidopsis* include those of the major cytosolic APX (APX1) in high light acclimation (17), the overlapping functions of chloroplast APX and 2-cys-PRX in processing H_2O_2 in this organelle (4), and the importance of a specific isoform of catalase (CAT2) to remove H_2O_2 produced in the peroxisomes during photorespiration (113).

Among these loss-of-function *Arabidopsis* lines with compromised capacity for removing H_2O_2 , catalase-deficient mutants are the best characterized. Their decreased capacity to remove H_2O_2 leads to a conditional phenotype that is easily controlled by varying the external CO_2 concentration (113). At high CO_2 , where photorespiration is largely suppressed, they show wild-type characteristics, in terms of phenotype and tissue redox state (ie, no oxidative stress). As well as its role in photorespiration, CAT2 has been implicated in the modulation of leaf senescence and regulation of signaling through phytohormones (36,134,137). Many of the phenotypic alterations and changes in gene expression observed in *cat2* are related to alterations in signaling through phytohormones such as auxin, salicylic acid, and jasmonic acid (13,36,47,48,89,101). Together with the facts that H_2O_2 is produced through a physiologically relevant pathway (photorespiration), and that the production can be easily controlled by external conditions, these observations suggest that *cat2* is an interesting study system for understanding oxidative stress.

Response of glutathione to increases in intracellular H_2O_2

The clearest biochemical redox change observed in *cat2* leaves is an accumulation of total glutathione, mainly in the form of GSSG (90). Interestingly, both phenotypes and phytohormone signaling triggered by the *cat2* mutation seem to be at least partly dependent on this adjustment in glutathione status (47,48,89). Modifications of glutathione appear to be a conserved response to catalase deficiency, as they have also been reported in a catalase-deficient line of a barley mutant, isolated via a photorespiratory screen (133), and in tobacco transformants, in which leaf catalase expression was markedly decreased by antisense technology (155). Treating *Arabidopsis* cells and plants with the catalase inhibitor, 3-aminotriazole, also causes accumulation of glutathione as GSSG (81,118). Accumulation of oxidized glutathione is also a well-documented response in plants undergoing stress such as ozone, cold, pathogens or salicylic acid treatment (5,23,39,68,82,127,150).

Accumulation of GSSG in *cat2* clearly points to compensatory adjustments in redox state as one of the players in H_2O_2 metabolism is removed. However, the pathways by which GSSG accumulates during oxidative stress remain unclear, due to the complexity discussed in the previous section and the various possible routes through which glutathione oxidation might occur (119). In contrast to the GSSG accumulation observed in *cat2* under

moderate stress, ascorbate remains highly reduced. At first sight, this might suggest that glutathione oxidation triggered by increased availability of H_2O_2 is independent of ascorbate and occurs more directly through enzymes such as GPXL. However, as discussed above, these enzymes are misleadingly named, as GSH is unlikely to be their physiological substrate. Although other enzymes could link H_2O_2 removal to GSH oxidation, several studies on lines carrying mutations for both CAT2 and either APX and DHAR suggest that the ascorbate-glutathione pathway is the major route that operates to remove H_2O_2 when CAT is less able to do so (117,152).

In addition to the ability of ascorbate to remain at wild-type reduction levels in *cat2* (even when oxidative stress is evident from GSSG accumulation and induction of marker transcripts), H_2O_2 contents are also quite stable. Although one study described a two-fold increase in H_2O_2 in *cat2* (36), in our own work such reproducible increases have never been observed, with leaf H_2O_2 contents at most slightly or transiently increased in *cat2* (101). However, there are difficulties surrounding the accuracy of H_2O_2 assays in plants (114) and, despite the ongoing development of techniques to detect H_2O_2 and related molecules in planta (1,25,86,125,126), our knowledge of H_2O_2 concentrations in optimal and stress conditions remains limited (35,100). This is an important gap in our knowledge, because it restricts interpretation of the relationships between different biochemical pathways in plants, as well as the ability to predict or assess the properties of components that could be important in sensing and transmitting H_2O_2 signals.

Given these observations and uncertainties, we sought to develop and exploit a model that might facilitate understanding of relationships between H_2O_2 , ascorbate, glutathione, and related components in leaf cells performing photosynthesis. In developing this model, our specific aims included (i) to explore the processing of H_2O_2 produced through major photosynthetic routes in C_3 plants (the electron transport chain and photorespiration) and its potential impact on cell H_2O_2 concentrations; (ii) to investigate interactions between the ascorbate-glutathione cycle and catalase function; and (iii) to identify the key factors necessary to allow accurate simulation of observed, real-world responses in ascorbate and glutathione status in both optimal and stress conditions. To achieve this simulation we used (where possible) available data for enzyme capacities and affinities. Below, we explore some of the key sensitive points which dictate whether a single model configuration is able to reproduce the status of ascorbate and glutathione in optimal and oxidative stress conditions.

Models of ROS processing in plants

A model of the ascorbate-glutathione pathway in the chloroplast was published some years ago (112) and has since been refined (148,149). These simulations allow calculation of the concentrations of compounds and fluxes of each step of the pathway as a function of factors such as light intensity, which accelerates production of superoxide by the photosynthetic electron transport chain. They have been useful in facilitating understanding of the operation of the pathway. However, they are confined to chloroplastic processes. As noted above, the peroxisomal reactions of photorespiration can make a major contribution to metabolically produced H_2O_2 . Our aim was to model H_2O_2 production and processing through this pathway by considering both catalase and the ascorbate-glutathione pathway, within the imposed constraints of outputting values for ascorbate and glutathione

content and redox states that correspond to measured data. Introducing such constraints introduces at least a partial experimental validation of the model in that it identifies configurations able to achieve the target output. By discounting the more unrealistic ones (based on available knowledge) the model can act as an aid to data interpretation and to pinpointing interesting areas for further investigation.

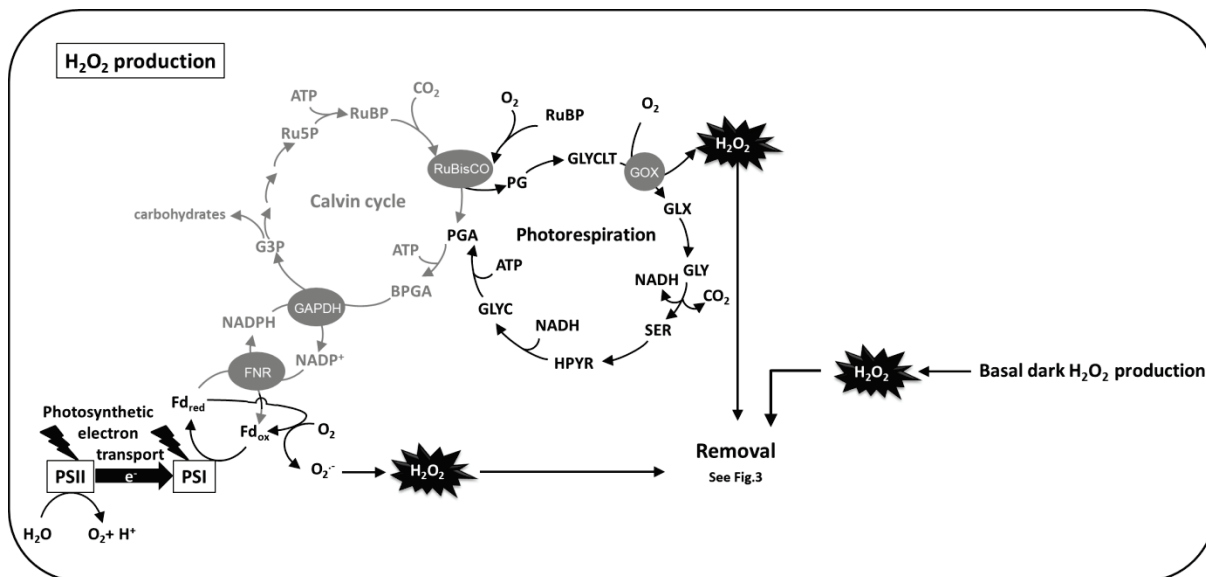
The model we present here required coupling H_2O_2 processing to its production through the light-dependent photorespiratory pathway, which involves several subcellular compartments. In planta, with the possible exception of catalase, all the enzymes included in the model are found in more than one compartment while all the metabolites (H_2O_2 , ascorbate, glutathione, NADP(H)) are also distributed across several locations, with their pools linked by the activities of transporters. While some of these transporters are being identified (80,94,100), not enough is known about the properties of most of them to allow realistic parametrization in the model. Hence, we collapsed the modelled reactions of photosynthesis and photorespiration to a single compartment. However, we did introduce an element of subcellular compartmentation by considering the vacuole, which was conservatively estimated to represent 80% of the total cell volume. As discussed below, this was found to be necessary to produce accurate simulation of certain experimental data, as was the inclusion of the glutathione synthesis pathway, another novel aspect within the context of models of ROS metabolism.

Simulating photorespiratory H_2O_2 production, metabolism and accumulation

The model was run throughout a repeated day-night cycle similar to the growth conditions for production of plant samples to obtain data on ascorbate and glutathione used to validate the model. Because we sought to compare modelled data with experimental data, we used the same photoperiod in the model as for plant growth (16h with 8h darkness) and focused most of the study on a single light intensity (a moderate irradiance of $200 \mu\text{mol.photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). To introduce a degree of environmental realism and to facilitate smooth transitions in the model, the changes between light and dark were programmed gradually over a period of 2h. While H_2O_2 can be produced by various reactions located at several subcellular sites, a significant source in the light is the photorespiratory enzyme, glycolate oxidase (GOX), a peroxisomal enzyme that oxidizes glycolate initially produced, as phosphoglycolate, by ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) oxygenation in the chloroplast (Fig. 2A). To allow calculation of the rate of RuBP oxygenation and photorespiratory H_2O_2 production, we used published models of the Calvin-Benson cycle and photosynthesis (26,27,143,144; see Supplemental File 1 for details). At an irradiance of $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, the calculated steady-state rates of net CO_2 assimilation (A), intercellular CO_2 concentration (C_i), and the ratio of carboxylation to oxygenation achieved in the middle of the photoperiod were $7 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $288 \mu\text{mol.mol}^{-1}$, and 3.85, respectively. This produced a realistic rate of RuBP oxygenation (PR) that was about 30% of the rate of net CO_2 uptake, A (Fig. 2B, top right (64)). During the GOX reaction, O_2 is reduced to H_2O_2 . Assuming that all glycolate is metabolized by GOX, there should be a 1:1 relationship between glycolate production and H_2O_2 production.

To avoid artificially considering photorespiratory H_2O_2 production in isolation, we introduced two other sources. First, H_2O_2 generation from superoxide produced by the photosynthetic electron transport chain was modelled as

A



B

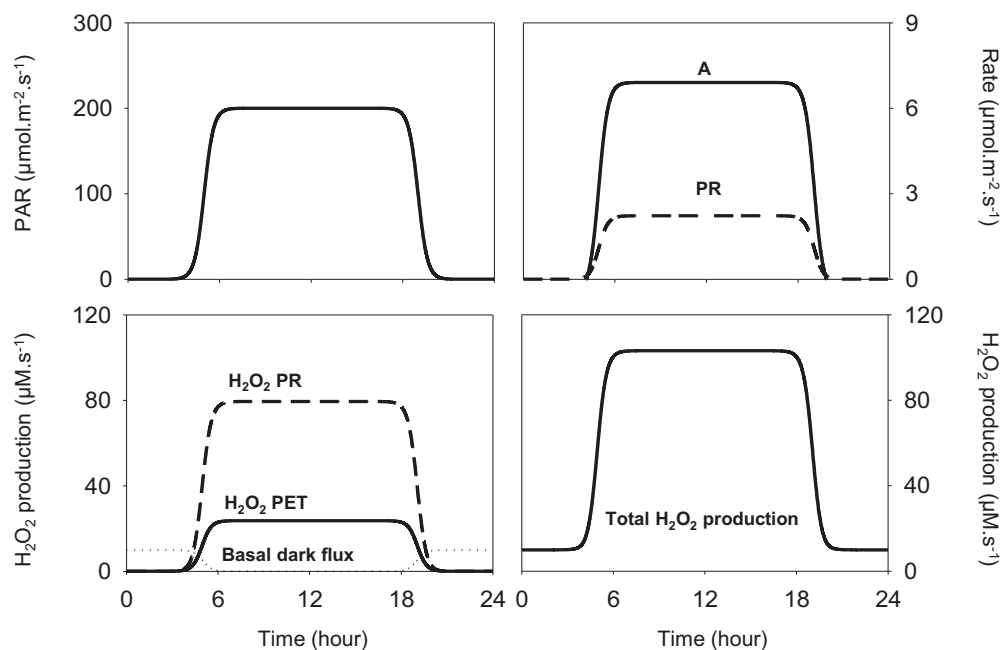


FIG. 2. Modeling H₂O₂ generation through the photorespiratory pathway. (A) Photorespiration is considered to be the main source of H₂O₂ in the model. However, additional H₂O₂ generation through photosynthetic electron transport (PET) and dark respiration were also integrated. ATP, adenosine triphosphate; BPGA 1,3-bisphosphoglycerate; Fd_{red/ox}, reduced/oxidized ferredoxin; FNR, ferredoxin-NADP⁺ reductase; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GLX, glyoxylate; GLY and SER are amino acids; GLYC, glycerate; GLYCLT, glycolate; GOX, glycolate oxidase; HPYR, hydroxypyruvate; NADP(H), oxidized and reduced forms of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PG, phosphoglycerate; PGA, 3-phosphoglycerate; PSI/II, photosystems I/II; Ru5P, ribulose 5-phosphate; RuBisCO, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate. The stoichiometry of the reactions is not shown. **(B)** Calculated changes in net CO₂ assimilation (A); photorespiration (PR), and H₂O₂ production linked to photosynthetic electron transport (PET), photorespiration, and basal dark respiratory flux during the day-night cycle according to the model using an imposed PAR (photosynthetically active radiation) of 200 μmol.m⁻².s⁻¹ during a 16h photoperiod.

1.5% of the total photosynthetic electron transport rate. Second, a night-specific, respiratory-dependent production of H_2O_2 was assumed (see Supplemental File 1 for details). The rates of H_2O_2 produced by the three sources is shown in Fig. 2B, bottom. Photorespiration accounted for 77% of the total production in the light (Fig. 2B). This is consistent with a previous analysis that used a modelling approach to estimate photorespiratory rates from experimental measurements of net CO_2 uptake (128), based on a simpler calculation of rates of RuBP oxygenation (105).

Catalase and the ascorbate-glutathione system in the control of H_2O_2 accumulation

The three sources of H_2O_2 were considered to contribute to a single pool, to which we coupled the reactions of H_2O_2 removal (Supplemental File 1). In addition to the photorespiratory source of H_2O_2 , novel aspects of the model were the operation of CAT and APX in parallel (unless stated otherwise), the introduction of NADPH-generating reactions through FNR or NADP-dependent dehydrogenases, the inclusion of a redox-regulated glutathione synthesis pathway, and the introduction of compartmentation for GSSG, whose distribution between the vacuole and the rest of the cell was determined by an ABCC-type transporter function (Fig. 3). Therefore, the two forms of glutathione were considered to be differentially distributed, with GSSG allowed to accumulate in both the vacuolar and extravacuolar compartments, while GSH was confined to the latter. As described in detail in Supplemental File 1, reactions were parametrized based on data available for extractable enzyme capacities, substrate affinities (K_M), and likely concentrations for initial metabolite pool sizes.

Although it is commonly accepted that H_2O_2 can be produced at high rates in plant cells, and that contents increase during stress conditions, there is considerable uncertainty about the range of concentrations found in plant cells. A survey of literature values shows great variability between studies, with reported tissue values for H_2O_2 often in the $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{FW}$ range (114). Such values convert to global tissue concentrations in the mM range. By contrast, concentrations in animal cells are considered to be about one million times lower, in the nM range (131). The model constructed by Polle for the chloroplast ascorbate-glutathione pathway used an initial value of 0.5 μM , although H_2O_2 could reach very high (mM) values when antioxidant pools were depleted (112). A recent analysis that inferred H_2O_2 concentrations from catalase activities measured in vitro and calculated photorespiratory flux in vivo arrived at values of approximately 10 μM (35).

To investigate H_2O_2 accumulation in our model, we ran the coupled reactions shown in Figures 2 and 3 in the presence or absence of catalase activity. First, we examined H_2O_2 removal and accumulation as a function of light intensity from 25 to 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Fig. 4). When both CAT and APX were active, H_2O_2 removal was distributed about 60 CAT:40 APX, with the distribution increasing slightly towards CAT with light intensity as APX began to saturate somewhat (Fig. 4A, left). In the absence of CAT, the ascorbate-glutathione pathway was able to deal with all the H_2O_2 produced, up to and including an irradiance of 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Fig. 4A, right).

The relationship between H_2O_2 concentrations and light intensity (PAR) is shown in Fig. 4B for these two conditions: CAT and APX working together or APX working alone. To calculate H_2O_2 concentrations, we

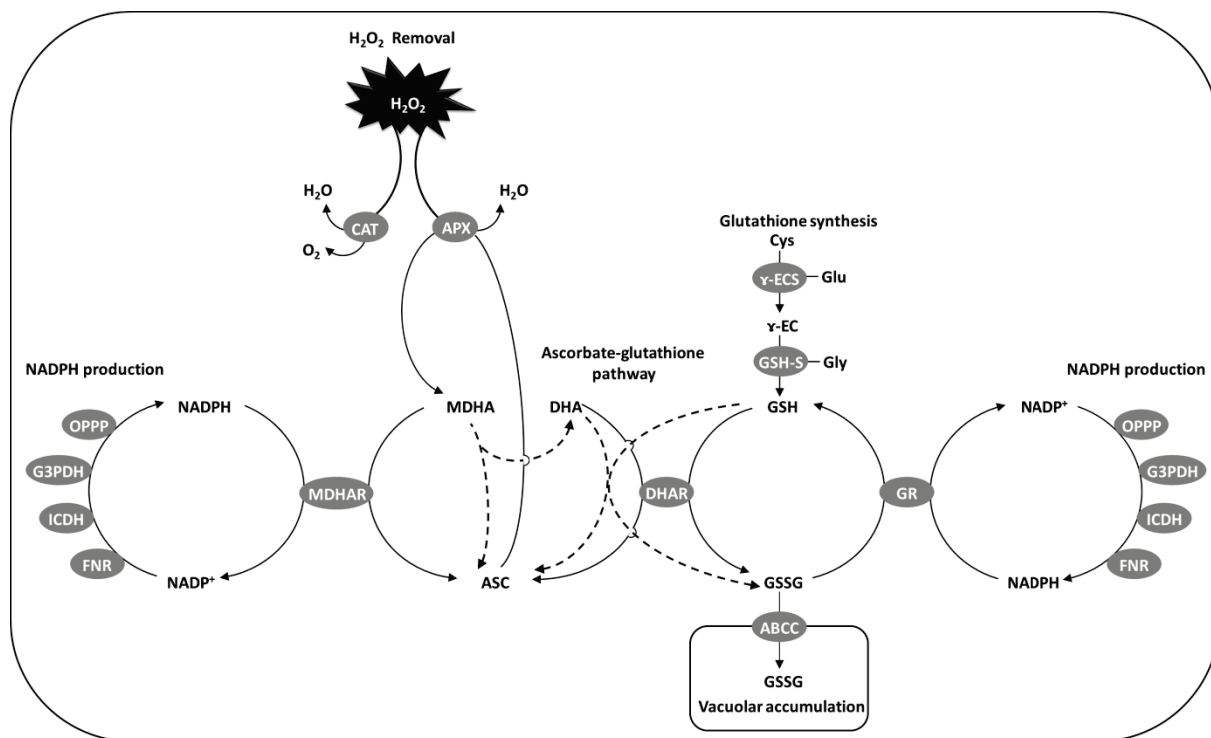


FIG. 3. Scheme of H_2O_2 metabolism through catalase and the ascorbate-glutathione pathway and linked reactions used in the model. The scheme incorporates H_2O_2 metabolism through CAT and APX as well as ascorbate, glutathione, and NADP redox turnover, glutathione synthesis, and vacuolar accumulation of the main oxidized form of glutathione, GSSG (glutathione disulfide). Continuous arrows show enzymatic reaction, broken arrows show nonenzymatic redox reactions. APX, ASC peroxidase; ASC, ascorbate; CAT, catalase; Cys, cysteine; DHA, dehydroascorbate; DHAR, DHA reductase; FNR, ferredoxin-NADP⁺ reductase activity that might contribute to the ascorbate-glutathione pathway; G3PDH, NADP-dependent cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; γ -EC(S), γ -glutamylcysteinylglycine (synthetase); Glu, glutamate; Gly, glycine; GR, glutathione reductase; GSH, reduced (thiol) form of glutathione; GSH-S glutathione synthetase; ICDH, isocitrate dehydrogenase; MDHA, monodehydroascorbate; MDHAR, MDHA reductase; NADPH/+, reduced and oxidized form of NADP; OPPP, oxidative pentose phosphate pathway; tonoplast ABCC transporters, also known as MRP (multidrug resistance-associated protein).

considered two conditions: one in which the accumulated H_2O_2 is distributed evenly throughout the cell in both vacuolar and extravacuolar spaces (Fig. 4B, left) and one in which it is confined to the outside of the vacuole (Fig. 4B, right), a space assumed to represent 20% of the total cell volume. This analysis revealed that, when both CAT and APX were operating at moderate light intensity ($200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), H_2O_2 concentrations did not exceed $1 \mu\text{M}$ (even distribution, left) or $5 \mu\text{M}$ (H_2O_2 outside the vacuole, right). Even at high light intensities that were sufficient to approach saturation of photosynthesis ($800 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), H_2O_2 concentrations were about $2 \mu\text{M}$ (even distribution) or $10 \mu\text{M}$ (assuming negligible H_2O_2 in the vacuole; data not shown). When catalase capacity was set to 0, H_2O_2 concentrations were about 4-fold higher (Fig. 4B). However, they still did not exceed $5 \mu\text{M}$ if an even distribution across the cell was considered (Fig. 4B, left).

From the above model outputs, the following inferences are possible. First, even though catalase is sometimes considered in the literature to be functional principally at high H_2O_2 concentrations, this enzyme makes a substantial contribution to keeping H_2O_2 at low levels when production rates are high. Intracellular H_2O_2 concentrations are maintained at particularly low values if CAT and APX are both present: about $1 \mu\text{M}$ at moderate light and $2 \mu\text{M}$ at high light. Second, the amount of H_2O_2 that accumulates is extremely small compared to the rates of production and removal. The rate of production at $200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ was about $100 \mu\text{M.s}^{-1}$ for a period of several hours (Fig. 2B). Hence, the total accumulated H_2O_2 (Fig. 4B, left) did not exceed the amount that could be produced during 10 ms (CAT and APX active) or 43 ms (only APX active). Third, H_2O_2 increases when catalase is absent: in relative terms, this is quite significant (4.3-fold) but in absolute terms, H_2O_2 still remains in the low μM range thanks to rapid metabolism through APX and the ascorbate-glutathione system. Fourth, the calculated concentrations would make only a minor contribution to typical H_2O_2 contents that are commonly reported in the literature, since global H_2O_2 accumulation (even distribution throughout the cell, Fig. 4B, left) would contribute approximately $1 \text{ nmol.g}^{-1} \text{ FW}$ (active CAT) or $4.3 \text{ nmol.g}^{-1} \text{ FW}$ (no CAT) at a light intensity of $200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Explanations for this discrepancy could include preferential accumulation of H_2O_2 in the extracellular compartment, which is not considered in the model, as well as possible over-estimation of tissue contents caused by a lack of specificity in H_2O_2 assays (102).

Although the model was able to run at light intensities as high as $800 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ if CAT and APX were both present, the different pools (H_2O_2 , ascorbate, glutathione, NADPH) failed to equilibrate at irradiances much above 200 when CAT was set to 0. With the enzyme capacities introduced for the ascorbate-glutathione system and associated reactions, the glutathione reduction state fell to 0. This is broadly consistent with data for the *Arabidopsis cat2* mutant, which shows increasingly severe oxidative stress and dwarf phenotypes as growth irradiance increases (113,151). For several reasons, the model when run without CAT may represent more extreme conditions than those occurring in planta in *cat2*. First, residual catalase activity exists in *cat2* linked to CAT1 and CAT3, although it is not clear whether these proteins are found in photosynthetic cells (90). Second, other H_2O_2 -metabolizing enzymes, such as PRX (4), may make a contribution, thereby conferring greater stability in planta. Our choice of CAT and the ascorbate-glutathione pathway as the main pathways for H_2O_2 removal was based on experimental observations suggesting that CAT and APX play a key role in protecting the plant genome from damage produced by excess photorespiratory H_2O_2 (152), and observed increases in APX and MDHAR activities, as well as the accumulation of GSSG and ascorbate-associated transcripts in catalase-

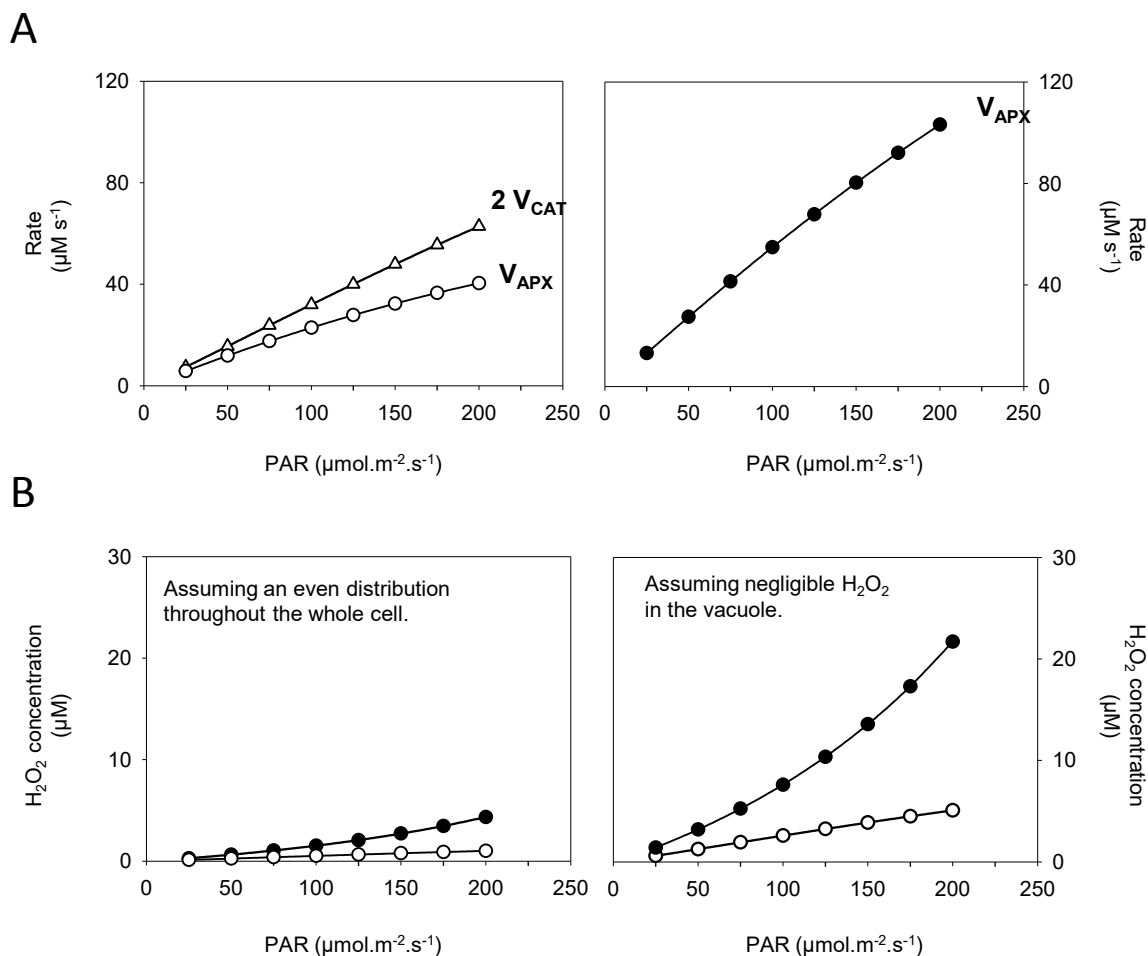


FIG. 4. Modelled H₂O₂ concentrations during operation of the integrated reactions shown in Figures 2 and 3. (A) Rates of H₂O₂ removal by CAT and APX (left) or by APX in the absence of CAT (right). (B) H₂O₂ accumulation in the presence of both CAT and APX (white symbols) or APX alone (black symbols). H₂O₂ concentrations were calculated from the model assuming an even distribution throughout the cell (left) or only outside the vacuole (right). CAT capacity was set to 150×10^3 or $0 \mu\text{M.s}^{-1}$ (white and black symbols, respectively), mimicking the physiological conditions in wild-type leaf cells or in catalase-deficient plants. H₂O₂ production rate was set as in Figure 2B and values obtained in the middle of the photoperiod (after 8h light) were used. See text for further explanation.

deficient plants (89,113,117). A third reason is that H_2O_2 production may be down-regulated in plants in which H_2O_2 removal capacity is compromised (63,124). A final factor to take into account in comparing the model with catalase-deficient plants is compensatory up-regulation of antioxidative systems, which is well known to occur in response to oxidative stress. As noted above, the activities of several enzymes of the ascorbate-glutathione increase when catalase is genetically or chemically decreased in plants (89,117). Although this point was not explored in detail in the present work, we did examine the effects of up-regulation of APX. When the model was run with a two-fold increase in APX capacity, to simulate the induction observed in oxidative stress conditions, steady-state H_2O_2 concentrations decreased three-fold (Table 1). This confirms observations previously reported from models of the chloroplast ascorbate-glutathione pathway (112) and underscores the importance of up-regulation of H_2O_2 -processing enzymes to maintain this oxidant at relatively low concentrations.

In addition to effects observed in catalase-deficient plants, several studies have revealed an increased activity of APX in response to various abiotic stresses such as salinity, drought, metal toxicity, chilling, UV irradiation or high concentrations of pesticides (9,16,75,129,130). APX is encoded by several genes in plants (nine in *Arabidopsis*), and studies of loss-of-function lines have shown that chloroplast and cytosolic isoforms act to counter stress in conditions such as high light, drought, heat, or treatment with ROS-generating agents like methyl viologen (17,69,78,98,111). Cytosolic APX activity may be particularly important in metabolizing H_2O_2 outside the chloroplast. Even though the cytosol is not thought to be a major source of ROS, APX1 responds strongly to different types of stress, including peroxisomal-derived oxidative stress in catalase-deficient plants (57,89,158). For these reasons, we parametrized the model using the properties of cytosolic APX. As the results indicate, APX shares a considerable part of the total H_2O_2 processing, even when CAT is active (Fig. 4A, left). It is unclear whether this is a fully accurate reflection of the *in vivo* situation, where CAT may be more concentrated in the peroxisomes and, perhaps, likely to process a bigger share of the H_2O_2 produced in this compartment. Nevertheless, when CAT is absent or low, the cytosolic ascorbate-glutathione system probably plays a key part, as indicated by several studies of plants deficient in CAT (89,117,118,152). Below we discuss the consequences for ascorbate and glutathione status.

Simulating ascorbate and glutathione responses to H_2O_2

Even though ascorbate and glutathione are often considered to work together, the extent to which they are redox-coupled *in vivo* is still not clear (33). One of our main aims was to develop a model that was able to reproduce accurately the status of ascorbate and glutathione pools in optimal and oxidative stress conditions over a time-course involving several light-dark cycles. With the model, we were able to calculate the cellular concentrations over time of ascorbate and glutathione, as well as their reduced and oxidized forms and, therefore, their redox states. We sought to adjust the model to a configuration that was able to reproduce the status of both ascorbate and glutathione observed in both *Arabidopsis* wild-type (Col-0, no oxidative stress) and the catalase-deficient oxidative stress model, *cat2*. For this, a detailed experimental analysis of ascorbate and glutathione status was performed in the two lines. Briefly, we grew plants at high CO_2 , where photorespiration is suppressed and *cat2* does not suffer oxidative stress: after three weeks of growth, plants were transferred to air to allow production of H_2O_2 through the photorespiratory pathway. Samples were taken at several points throughout the day-night

TABLE 1. CALCULATED EFFECTS OF INCREASING APX CAPACITY ON STEADY-STATE CONCENTRATION OF H₂O₂ IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF CATALASE

	APX capacity	[H ₂ O ₂] _{whole cell}	[H ₂ O ₂] _{excluding vacuole}
	($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$)	(μM)	(μM)
+CAT	200	1	5
-CAT	200	4.3	21.7
-CAT	400	1.4	7

The model was run at a PAR of $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ for 4 days with catalase capacity set to 0 or $150 \times 10^3 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$. The two concentrations at left and right refer to values calculated using the volume of the whole cell, including the vacuole (left), or assuming that H₂O₂ does not accumulate significantly in the vacuole (right). The upper two rows corresponds to Fig. 4B, final points on the curves (white symbols, +CAT; black symbols, -CAT). The bottom row simulates a situation in which APX is up-regulated 2-fold in response to oxidative stress conditions.

cycle, and ascorbate and glutathione contents and redox state were measured (see Supplemental File 2 for experimental details). No significant differences were observed in total ascorbate between Col-0 and *cat2* (Fig. 5, top left panel). In both lines, ascorbate was maintained in a highly reduced state (Fig. 5, left). In contrast to ascorbate, glutathione became progressively oxidized and accumulated in *cat2* but not in Col-0 following transfer to air (Fig. 5, left panel, lower frames). These results are in broad agreement with previous studies of catalase-deficient plants (47,89,133,155).

These experimental observations on plants growing at moderate irradiance were used as real-world constraints on the modelled data. These constraints can be summarized as follows. First, both ascorbate and glutathione should remain highly reduced when CAT is active. Second, ascorbate should remain highly reduced even when CAT is absent. Third, glutathione should accumulate, mainly as GSSG, when CAT is absent. The data for H₂O₂ concentrations described above were obtained when the model was configured to meet these three constraints. To allow the modelled data for ascorbate and glutathione to be compared with the experimental results (expressed in nmol.g⁻¹FW), we converted them to amounts in terms of nmol.ml⁻¹ cells. The term “nmol.ml⁻¹ cells” was preferred to μ M because two intracellular compartments with heterogeneous volumes and GSSG concentrations were considered in the model. These were the vacuole, in which GSSG can accumulate, and the extracellular space, in which all other reactions, including those involving GSH and GSSG, took place. This compartmentation was introduced based on our previous results showing that the vacuole accounts for a significant part of the accumulated GSSG in *cat2* (104,115). Hence, tonoplast transporters of the ABCC type (65,120), which are known to be competent for import of GSSG (74,139), were introduced into the model.

Allowing for some variation in the experimental data (Fig. 5, left), the model is able to reproduce with acceptable fidelity the constancy in both the amount and redox state of ascorbate in the two lines, in which the two modelled traces are too similar to be distinguished (Fig. 5, upper right panels). Likewise, for glutathione, the model was able to output data simulating the plant response. In the +CAT simulation (right), corresponding to Col-0 (left), glutathione contents remained stable and the reduction state high (Fig. 5). In the -CAT condition (right), simulating *cat2* (left), glutathione progressively accumulated over the four days, and this was accompanied by a progressive drop in the reduction state to about 50% reduced (Fig. 5). Configuring the model to accurately simulate the experimental data required numerous sensitivity analyses in which the effects of modifying different parameters were examined. We discuss some of the key factors below.

Pathways of glutathione oxidation and light-dependent regulation of ascorbate synthesis

While several classes of GSH-dependent enzymes could potentially be involved in H₂O₂ processing independent of the ascorbate pool (119), our data suggest that they are not necessary to reproduce experimental observations. Real-world responses of glutathione could be reproduced with acceptable accuracy without assuming ascorbate-independent pathways of glutathione oxidation. By contrast, as discussed in the sections below, modelling of redox-regulated glutathione synthesis and ABCC transporter-mediated uptake into the vacuole, where reduction

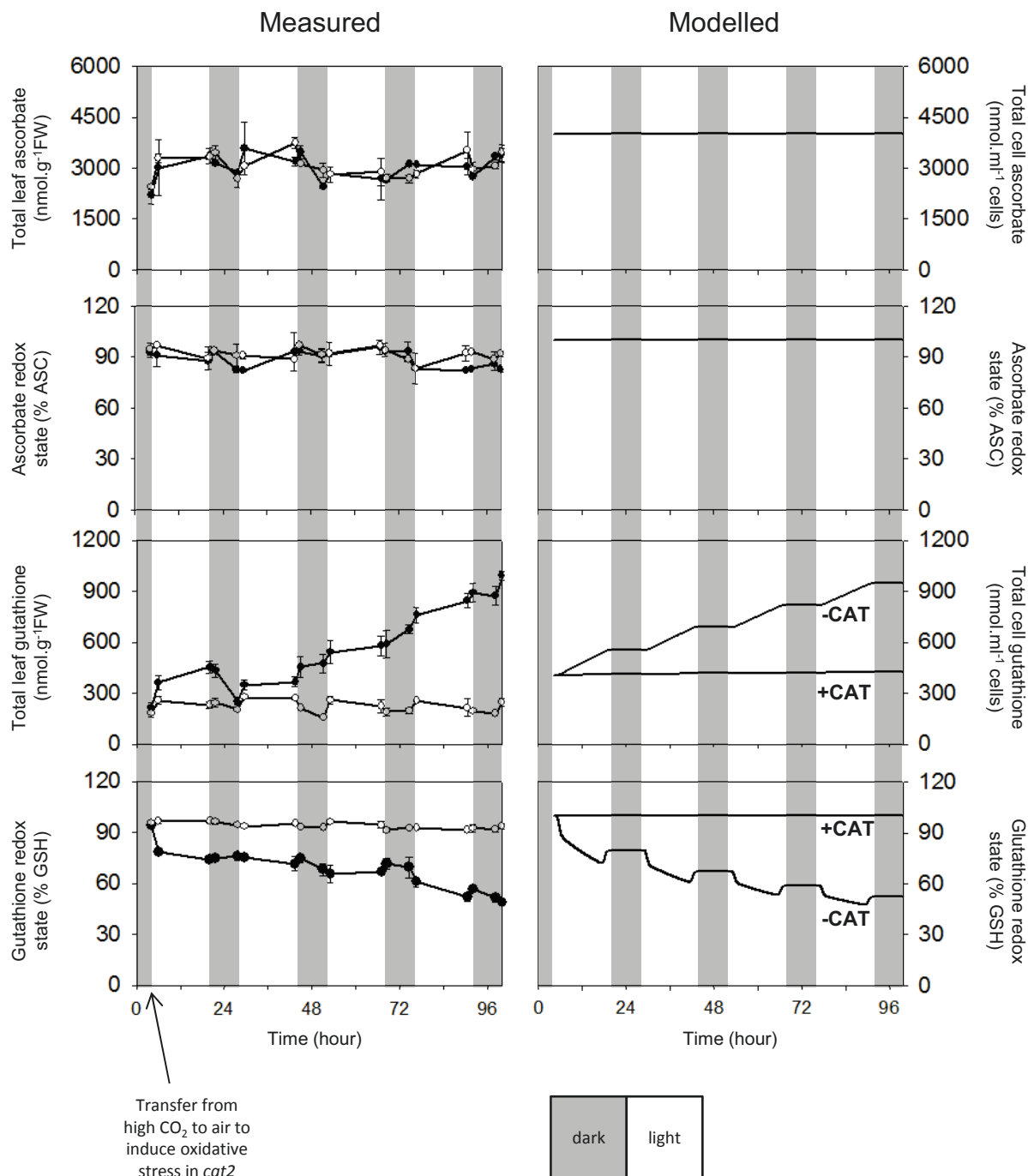


FIG. 5. Comparison of modelled changes in ascorbate and glutathione concentrations and redox states with experimental data in the presence and absence of catalase activity. Left panels: the Arabidopsis catalase-deficient photorespiratory *cat2* mutant was grown in high CO₂ for three weeks at an irradiance of 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ in a 16h photoperiod before being transferred to air (arrow). Ascorbate and glutathione contents and redox states were measured at regular intervals in *cat2* (black symbols) and the wild-type, Col-0 (white symbols) during the first four days after transfer and expressed in conventional units (nmol.g⁻¹FW). Values are means $\pm$ SE of 3 plants. Right panels: the model was run at two catalase capacities for a period of four days (200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 16h photoperiod). +CAT, catalase capacity was set at $150 \times 10^3 \mu\text{M.s}^{-1}$. -CAT, catalase capacity was set to 0. Differences in ascorbate were too small to be distinguished by the plots. White areas, light period. Gray areas, dark period.

of GSSG to GSH is thought to be negligible, proved to be essential to produce a good approximation of the experimental data.

While we incorporated the pathway of glutathione synthesis, we did not introduce ascorbate biosynthesis. The fundamental reason for this was that ascorbate status is not significantly altered in either wild-type or *cat2* Arabidopsis grown at constant, moderate irradiance (Fig.5). Nevertheless, it is known that irradiance is an important factor determining ascorbate contents, due to light-regulation of the synthetic pathway (22,38,40,132). The biological importance of this response may be related to chemical reactions of ascorbate with light-dependent ROS or the requirement for ascorbate to regenerate tocopherol or to produce zeaxanthin, reactions that are both involved in the dissipation of excess excitation energy and the deactivation of and singlet oxygen in the thylakoid membrane (29,45,97). As our main aim was to model the ascorbate-glutathione pathway at a single irradiance, we did not consider light-regulation of ascorbate contents. Changes in total ascorbate contents and redox state have been reported during day-night cycles, with ascorbate accumulating and becoming more oxidized throughout the day (22). Such changes may be dependent on the photoperiod and/or irradiance, because in our conditions (16h photoperiod, 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), they are much less apparent. Increases in total ascorbate contents throughout the photoperiod were at most relatively minor, and the reduction state remained at a fairly constant value of 90% in both the wild-type and *cat2* (Fig. 5, left, upper two panels).

Impact of H₂O₂ processing on the modelled glutathione redox potential

Glutathione status is considered to be a key factor in the regulation of plant cell function (70,85,103). Although the processes that perceive and transmit glutathione status remain to be fully elucidated, one influential factor could be the redox potential, which may be sensed by proteins such as GRX. Most of the cellular glutathione that accumulated according to the model and most of the modelled effect on the global redox state (Fig. 5, right) was due to transport of GSSG into the vacuole. This recapitulates, at least in part, experimental observations in catalase-deficient plants (115). If this vacuolar GSSG is taken into account (ie, measured whole-tissue GSH and GSSG contents are considered), the calculated redox potential can reach very positive values (104). However, one of the functions of GSSG sequestration in the vacuole may be to avoid excessively oxidizing glutathione redox potential in other compartments (138), where it may be more critical for protein function. Hence, on the assumption that the vacuolar GSSG pool is not likely to contribute to the functional impact of changes in the glutathione redox potential, we restrict our discussion below to how the model computes changes in this factor in the extravacuolar compartment.

Measurements using in vivo probes (redox-sensitive GFP) suggest that the glutathione redox potential in compartments such as the chloroplast, mitochondria, peroxisomes, and cytosol is low, ie, highly reducing (of the order of -300 mV; 10,62,86,125). This implies that GSSG concentrations remain several orders of magnitude lower than GSH concentrations. When the model was run in the presence of both CAT and APX, conditions in which the ascorbate-glutathione pathway was responsible for about 40% of H₂O₂ processing (Fig. 4A, left), the glutathione redox potential of the extravacuolar compartment remained at values between approximately -350 mV (dark) and -300 mV (light). Interestingly, this effect points to a possible impact of light-dependent H₂O₂

production on the redox potential in photosynthetic cells, although the potential remained at values consistent with those reported experimentally (10,125). When the model was run without CAT, the higher load on the ascorbate-glutathione pathway caused the redox potential to fall to around -210 mV. This is somewhat more positive (more oxidizing) than values reported for stressed plants (62,86), possibly reflected the stronger glutathione oxidation linked to absence of CAT function compared to conditions such as wounding and drought. Nevertheless, despite the accumulation of GSSG in the absence of CAT function, GR activity was able to maintain GSH as the predominant form. In this condition, the extracellular GSSG concentration was calculated to be 117 μ M, and the extracellular GSH:GSSG ratio approximately 19.

Regulation of glutathione synthesis

In addition to including GSSG accumulation in the vacuole, accurate simulation of oxidative stress-induced changes in glutathione required introduction of the synthesis pathway from Glu, Cys, and Gly (Fig. 3). Preliminary analyses in which the model was run without equations to describe glutathione synthesis revealed, unsurprisingly, that no glutathione accumulation occurred and that GSH was quickly depleted, as it was converted, via oxidation and transport, into vacuolar GSSG.

In conditions favouring oxidation, the synthesis of glutathione is regulated by several processes involving the activation of cysteine and glutathione production at transcriptional and post-translational levels (5,54,116). We considered three potentially important regulation points in the model: (i) the feedback inhibition of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) by GSH, (ii) the redox-dependent activation of γ -ECS by thiol-disulfide exchange, and (iii) the availability of cysteine. For the first factor, a competitive inhibition term was incorporated into the equation describing γ -ECS activity (41,83), based on the K_i values previously reported for the tobacco and Arabidopsis enzymes (53,58). Together with the redox-regulation term, the feedback inhibition was necessary to avoid unrealistic accumulation of GSH (reduced form) in the simulation.

To introduce redox-regulation of γ -ECS, we considered the mechanistic studies that have revealed an activation of the enzyme by the formation of reversible disulfide bonds (53,58). Although the mechanistic nature of the links between cell redox status and γ -ECS activation state are not fully elucidated, we assumed for the purposes of the model that the enzyme would be responsive to the glutathione redox potential. While such a response may be less direct in vivo, it is consistent with studies of catalase-deficient plants, in which a conversion of GSH to GSSG is accompanied by accumulation of total glutathione (Fig.5, left, lower panels). Hence, we introduced into the model a redox-sensitive activation factor for γ -ECS in which the enzyme becomes progressively more active as the extracellular glutathione redox potential becomes more positive (Supplemental File 1; Eq. 17). This equation describes a sigmoidal function for the activation state of the enzyme, which increases as the glutathione redox potential becomes more positive, with a midpoint potential for 50% activation of -220 mV.

To examine the influence of this term on glutathione accumulation triggered by the absence of CAT, the model was first run without regulation. When γ -ECS was always inactive (activation by glutathione redox potential set

to 0), no accumulation of glutathione, either as GSH or GSSG, was observed (see above). When the enzyme was assumed to be always fully active (activation by glutathione redox potential set to 1), relatively high γ -EC concentrations were rapidly attained at the beginning of the time course, and they decreased progressively as feedback inhibition of γ -ECS became stronger (Fig. 6B, upper curves). The reason for this progressive inhibition was an accumulation of GSH in the extravacuolar space to reach more than two-fold the initial value (reduced form; Fig. 6B, lower right panel). We considered this effect unrealistic because it is not observed in catalase-deficient plants, in which GSSG accounts for the overwhelming part of the accumulated glutathione. Linking the activation state of the enzyme to the glutathione redox potential largely corrected this slow increase in GSH (Fig. 6B, lower right panel). In this condition, glutathione accumulated, largely as vacuolar GSSG, and the curves shown for total glutathione and redox state in Fig. 5 were obtained (Fig. 5, lower right panels, -CAT). In the case where both CAT and APX were active, the modelled configuration for γ -ECS led only to a slight (5%) increase in total glutathione (Fig. 5, right). This was because, even in the presence of light-dependent H_2O_2 production (Fig. 6A), the glutathione redox potential remained below -300 mV and so γ -ECS remained largely inactive. Hence, the model configuration was able to approximate both the substantial changes in glutathione in *cat2* and the stability of glutathione in the wild-type.

Production of glutathione is also promoted by increases in Cys (5,11), with several studies having shown that an increase in Cys is associated with an increase in GSH content (49,84,157). It is well documented that plant glutathione content is increased by artificial addition or augmentation of cysteine (7,8,43,50,161,162) or by overexpression of genes and enzymes involved in cysteine synthesis (50,79,106,156). Furthermore, short- or long-term blockage of the first stage of glutathione synthesis leads to a cysteine accumulation of up to 300% in some cell compartments (66), indicating that significant amounts of cysteine are used for glutathione synthesis. Hence, we examined how glutathione status depended on physiologically relevant concentrations of Cys within the model, assuming the K_M value reported for the Arabidopsis γ -ECS (1.6 mM: 58). The simulations revealed that Cys concentration was influential in determining both the total accumulation of glutathione (Fig. 6C, left) and the glutathione redox state (Fig. 6C, right). Relatively high concentrations were found to be necessary to reproduce the experimental data in the absence of CAT (Fig. 5). Strongly limiting Cys concentrations, such as 50 μM , prevented realistic accumulation of total glutathione (Fig. 6C, left) and, interestingly, also caused the reduction state to fall to unrealistically low values (Fig. 6C, right). This underscores the importance of the activation of Cys synthesis during oxidative stress conditions, in line with reports on the *cat2* mutant and on Arabidopsis exposed to higher atmospheric ozone levels (5,116).

The key role of MDHAR in determining glutathione oxidation

In the ascorbate-glutathione pathway, several routes can regenerate ascorbate for APX activity. As well as those shown in Fig. 3, ferredoxin may also reduce MDHA back to ascorbate in the chloroplast (95). As our analysis was focused primarily on a process that produces H_2O_2 outside the chloroplast (photorespiration), we considered NADPH- and GSH-dependent processes that involve reduction of MDHA and DHA, respectively. MDHAR is an effective system for recycling ascorbate, and is often up-regulated in stress conditions. For example, increases in MDHAR activity and induction of the Arabidopsis genes encoding the cytosolic isoforms (*MDHAR2*,

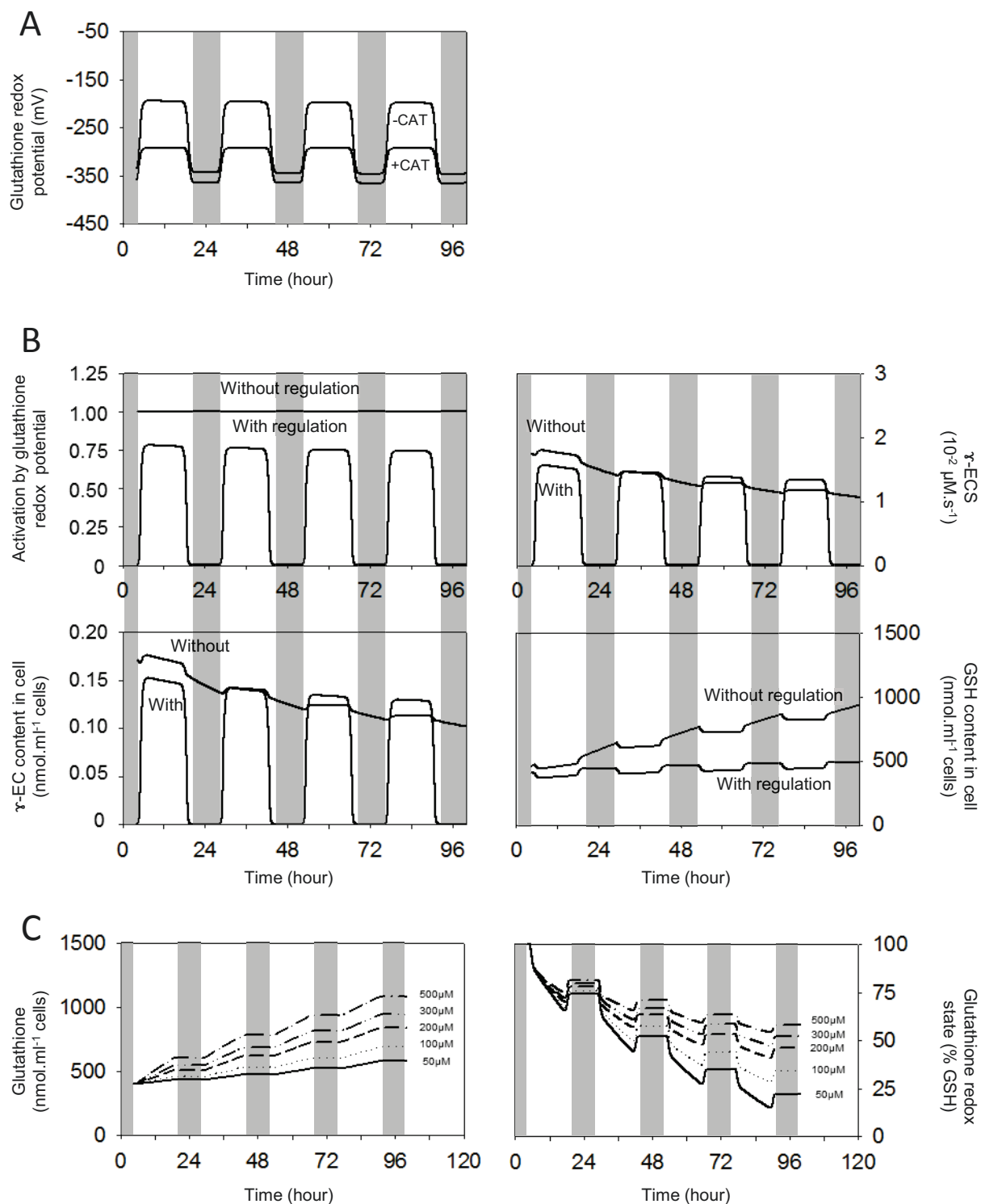


FIG. 6. Parametrization of the regulation of glutathione synthesis by linking activation of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) to the glutathione redox potential and influence of cysteine concentration. The model was run for 4 days under the conditions described in Figure 5. White areas, light period. Gray areas, dark period. **(A)** Glutathione redox potential calculated in response to H_2O_2 production with (bottom curve) or without CAT (top curve). **(B)** Influence of the redox potential activation factor (see text) for glutathione responses to increased H_2O_2 . The model was run without CAT activity. Top left, γ -ECS capacity without (top line) or with redox regulation (bottom line). Top right, γ -ECS activity (flux) in the two conditions. Bottom left, γ -EC accumulation in the two conditions. Bottom right, GSH (reduced glutathione) in the two conditions. **(C)** Impact of cysteine concentration on total glutathione content (left) and redox state (right).

MDHAR3) in the *cat2* mutant are consistent with an important role for the cytosolic isoforms of MDHAR in oxidative stress responses (118). Further, genetic manipulation of MDHAR expression levels can influence ascorbate status and plant stress resistance (24,61,135).

Despite the importance of MDHAR, any MDHA that escapes reduction can spontaneously dismutate to produce ascorbate and DHA, with reduction of the latter to ascorbate requiring glutathione, either chemically or to support DHAR activity. As noted in previous sections, when CAT and APX were both active, APX accounted for about 40% of H_2O_2 processing (Fig. 4A), and both ascorbate and glutathione remained highly reduced (Fig. 5, right, +CAT). In this case, over 99% of the ascorbate regeneration occurred through MDHA reduction. Hence, the glutathione pool played a very minor role in supporting ascorbate-dependent H_2O_2 processing when both CAT and APX were active. In these conditions, glutathione redox turnover was very slow.

A previous modelling analysis underscored the influence of MDHA reduction in determining redox-coupling between ascorbate and glutathione (112). Our model agrees with this earlier analysis and suggests that MDHAR is a key fulcrum that determines the degree of glutathione oxidation linked to APX-dependent H_2O_2 processing, particularly in oxidative stress conditions. To test this, we examined the effect of modest changes in the capacity of MDHAR in the -CAT condition, when flux through APX is high. At MDHAR capacities approaching the APX capacity, the flux of MDHA dismutation, and thus the flux through the glutathione pool, was relatively small (Fig. 7A). When MDHAR capacity was lowered from 170 to 120 $\mu M.s^{-1}$, enhanced MDHA dismutation produced DHA at higher rates, engaging the glutathione system (Fig. 7B). Consequently, the MDHAR capacity was a key factor determining the accumulation and redox state of glutathione (Fig. 7C). The curves shown on the right of Fig. 5 were produced using an MDHAR capacity of 140 $\mu M.s^{-1}$. At values lower than this, more glutathione accumulated (as GSSG) while at higher MDHAR capacities, accumulation of glutathione remained at values below those observed experimentally. Hence, our observations agree with those of Polle (112). They suggest that the coupling between ascorbate and glutathione pools is likely to be low when MDHAR capacity is high, as this acts as a “bottleneck” that prevents DHA formation.

Low NADPH triggers glutathione oxidation by limiting MDHAR but not GR

NADPH is an essential electron donor in many enzymatic reactions, including the ascorbate-glutathione pathway. We therefore investigated the effect of varying NADPH concentrations on the functioning of the pathway. We focused on the condition without CAT, to drive high rates of flux through APX and to simulate an oxidative stress condition. The model was run with total NADP(H) at values between 42.5 and 100 μM , and fluxes and other factors were plotted against the steady-state NADPH concentration (Fig. 8). Altering the NADP(H) concentration within this range had a negligible effect on the accumulation of H_2O_2 (data not shown) but it strongly impacted the content and the redox state of glutathione. When NADPH was approximately 26 μM , glutathione accumulated to high levels (Fig. 8, middle left), almost all as GSSG (Fig. 8, middle right). As a result, the total cell glutathione redox state was only 8 % GSH (Fig. 8, bottom left), and the extracellular glutathione redox potential rose to -142 mV (Fig. 8, bottom right). These extreme responses were progressively

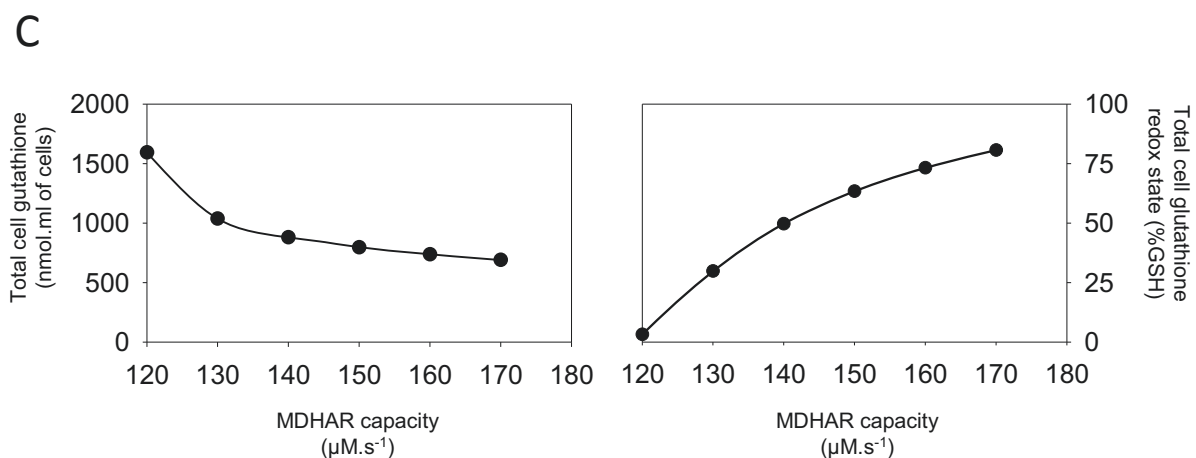
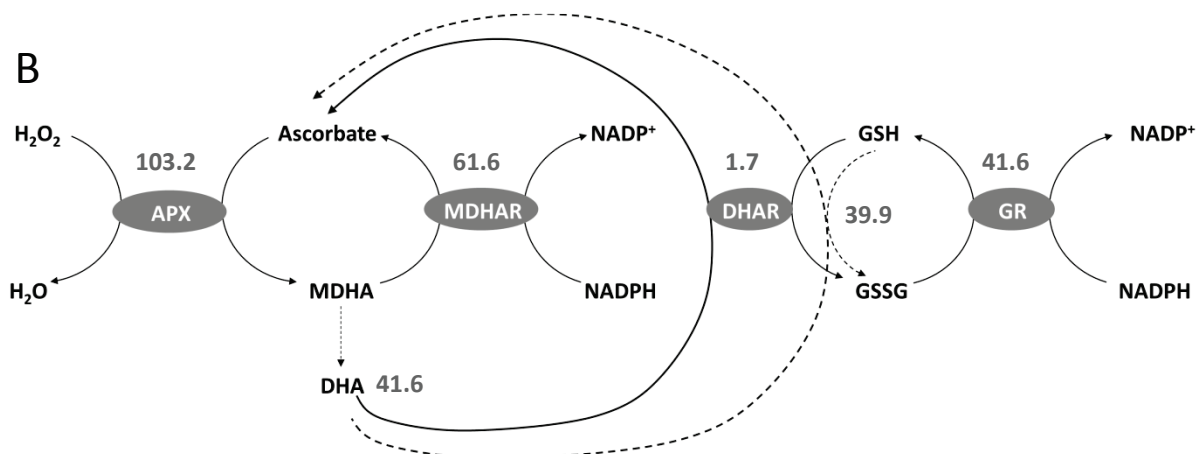
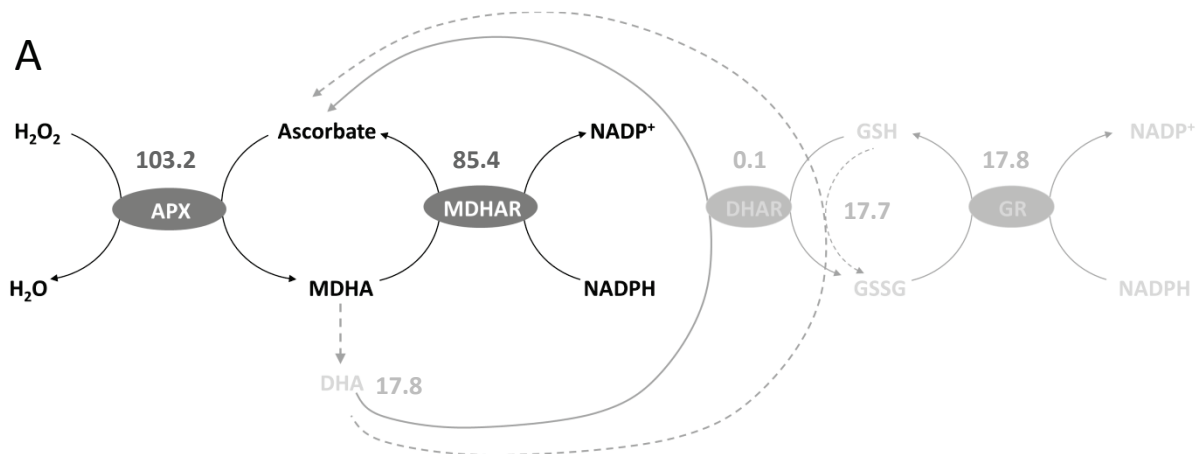


FIG. 7. Role of MDHAR capacity in determining the contribution of glutathione to H_2O_2 metabolism. The model was run in the absence of catalase activity at two capacities for MDHAR, other factors being set at the same value, for four days as in Figure 5. Data indicate values obtained in the middle of the photoperiod (after 8 hours light), corresponding to the 84h point in Figure 5. Numbers indicate flux in $\mu\text{M.s}^{-1}$ for H_2O_2 reduction (APX), NADPH oxidation (MDHAR), nonenzymatic formation of DHA and its reduction by GSH, enzymatic reduction of DHA (DHAR), and NADPH oxidation (GR). **(A)** Reaction rates at kinetic equilibrium in the presence of high MDHAR capacity. **(B)** Reaction rates at kinetic equilibrium in the presence of a lower MDHAR capacity. **(C)** Whole cell content of glutathione and its redox state plotted against MDHAR capacity between the two values used in A and B. For A and B : continuous arrows show enzymatic reactions and broken arrows show nonenzymatic redox reactions while black and grey arrows indicate engaged and less-engaged paths, respectively.

diminished as the NADP(H) pool was increased. At an NADPH concentration of 84 μM , oxidation and accumulation of glutathione were very small (Fig. 8). The NADPH concentration required to simulate the experimentally observed effects on glutathione (Fig. 5) was intermediate between these two values (34 μM).

These observations suggest that high concentrations of NADPH can antagonize glutathione oxidation during oxidative stress. This may be considered to be unsurprising. But how does it occur? In the ascorbate-glutathione pathway, two enzymes require NADPH: MDHAR and GR. We examined how the flux through these two enzymes depend on NADPH availability (Fig. 8, top panels). At high NADPH, 90% of the flux through APX was supported by MDHAR, with GR playing only a minor role (Fig. 8, top right). As NADPH decreased, MDHA dismutation increased (Fig. 8, top left) and GR became progressively engaged (Fig. 8, top right). Hence, while studies of Arabidopsis mutants show that the capacity of GR can clearly limit GSSG reduction during oxidative stress (89), the model suggests that conditions in which GR is limited by NADPH are likely to be rare. This is not only because of the low K_M of GR for NADPH (approximately 5 μM) but also because MDHAR has a significantly higher K_M (approximately 30 μM). Hence, in conditions where NADPH becomes limiting, MDHAR should be NADPH-limited before GR is affected. This favors MDHA dismutation, DHA production, and hence GSH oxidation. The net effect is increased production and increased concentrations of GSSG which, unlike NADPH, are limiting for GR activity. This explains why, over the range of the physiologically realistic NADPH concentrations that we examined, GSSG accumulation, glutathione oxidation state, and GR activity all progressively increase as NADPH decreases (Fig. 8).

NADPH-generating dehydrogenases and the ascorbate-glutathione pathway

It should be noted that the influence of NADPH on flux distribution in the pathway (Fig. 8) involved a limiting minimum value (about 26 μM) that was required for the model to equilibrate and to output realistic data when CAT function was absent. Below this value, GSH was depleted because of excessive production of DHA from MDHA dismutation. Given this crucial role of NADPH, we analyzed the importance of NADPH-generating enzymes. Plants contain several such enzymes but the most important in terms of capacity include the photosynthetic ferredoxin-NADP⁺ reductase (FNR), which is reduced by photosynthetically generated ferredoxin, and several NADP-dependent dehydrogenases that oxidize metabolic substrates. The latter include two dehydrogenases of the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP), isocitrate dehydrogenase (ICDH), and a cytosolic NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH). These and other NADPH-generating dehydrogenases have received some attention for their roles in the response to increased ROS availability. For example, activities of ICDH and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were up-regulated in olive in response to salt stress (147). Other data on gene expression and proteomics provided evidence that ICDH expression is influenced by stresses, including salt and cadmium (59,71,72,76,123,147). More direct analysis using loss-of-function mutants has thrown light on the importance of some of these enzymes in the response of plants to oxidative stress (18,20,73,87,88,91,121,153). Some of these studies suggest an apparent redundancy between the different NADPH-generating enzymes, and studies on organisms such as yeast also indicate overlapping roles. A double yeast mutant for G6PDH and cytosolic ICDH showed a loss of viability due to the accumulation of intracellular oxidants that was not observed in the single mutants (92).

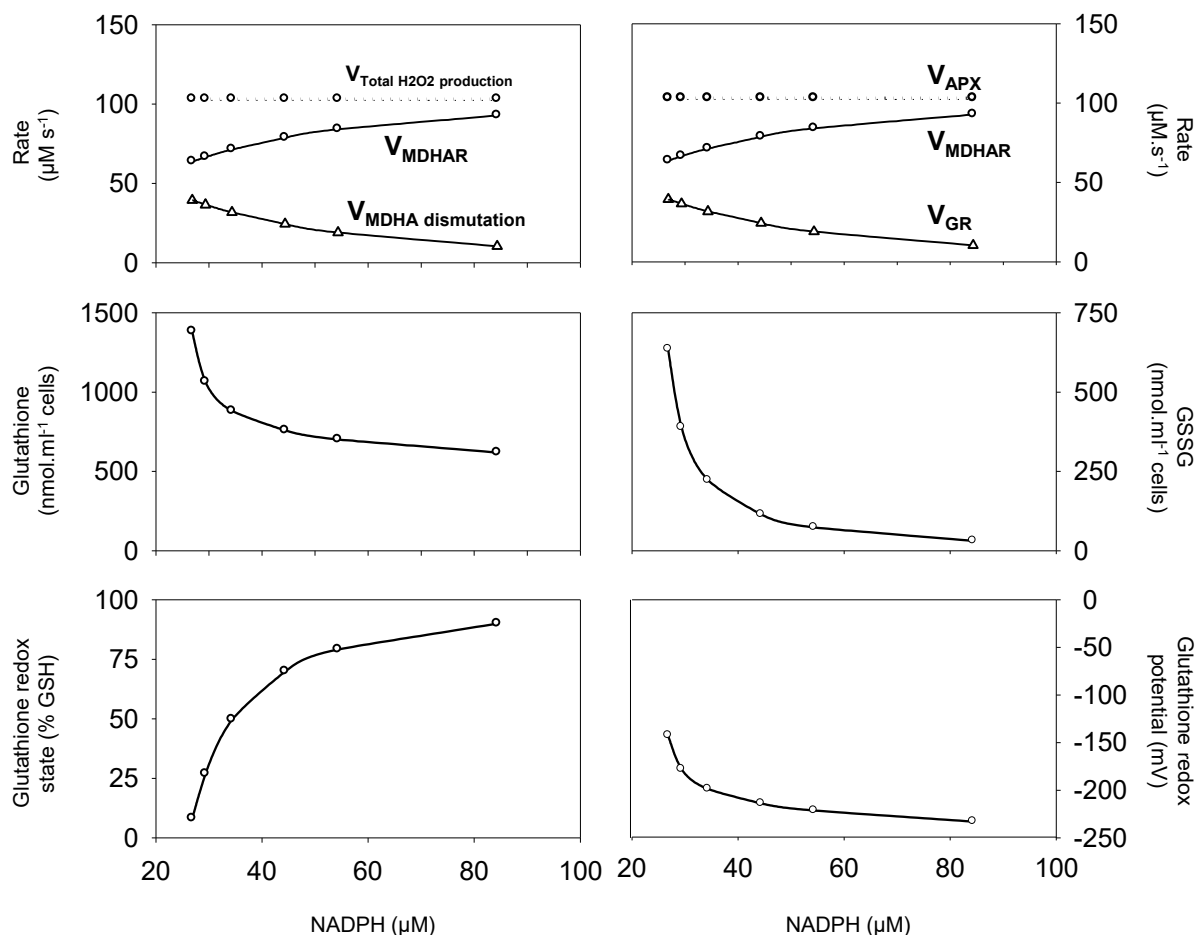


FIG. 8. Importance of NADPH concentration in the fate of MDHA and glutathione responses to H_2O_2 during oxidative stress conditions. The model was run without catalase activity according to conditions in Figure 5 and values taken in the middle of the fourth day (84h point in Figure 5). To enable direct comparison, rates in the top graphs are all expressed as two-electron exchanges as follows. Top left, H_2O_2 production from O_2 ; NADPH oxidation for MDHAR; 2 MDHA = ASC + DHA for dismutation. Top right, H_2O_2 reduction to water for APX; NADPH oxidation for MDHAR and GR.

We used the model to explore the relative importance of these NADPH-producing enzymes. While explicit compartmentation between the chloroplast and cytosol was beyond the scope of the present version of the model, we did introduce a constant basal contribution from the stromal FNR linked to the photosynthetic electron transport chain. Thus, while most of the flux through FNR was linked to NADPH production for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the Calvin-Benson cycle (Fig.2), a small part was allocated to NADPH production for H_2O_2 processing (Supplemental File 1). In addition to FNR, we considered NADPH production by the OPPP, ICDH, and G3PDH, parametrizing these enzymes where possible using available data for the capacities and kinetic properties of the cytosolic isoforms (Supplemental File 1). A sensitivity study in the absence of CAT revealed an inverse correlation between the minimum concentration of total NADP(H) required for the model to equilibrate and the number of NADPH-producing dehydrogenases (Table 2). Thus, while a total NADP(H) concentration of $42.5 \mu\text{M}$ and above allowed the model to achieve stability when all enzymes were present, this value increased to $80 \mu\text{M}$ when the two dehydrogenases of the OPPP were functioning alone (Table 2). It is notable that the OPPP was required in all cases, ie, the model would not equilibrate with only ICDH, only G3PDH, or only these two enzymes together. Thus, as might be anticipated, a small pool of NADP(H) could be compensated by increasing the capacity for regeneration of NADPH from NADP^+ .

We next examined the flux distribution between each NADPH-generating enzyme or pathway and the impact of removing each of them on the glutathione accumulation in oxidative stress conditions. For this, the irradiance was set as $200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, and a total NADP(H) concentration of $80 \mu\text{M}$ was set as a constant, so that all the conditions listed in Table 2 could be modelled. In the steady-state, fluxes of NADPH production can be directly compared with consumption of H_2O_2 by APX activity, since both NADPH production from NADP^+ and H_2O_2 reduction to water involve two-electron exchanges. In the presence of both CAT and APX, the production of NADPH to support the ascorbate-glutathione pathway ($40 \mu\text{M.s}^{-1}$; Fig.4A, left) was distributed fairly equally between FNR ($16 \mu\text{M.s}^{-1}$), the OPPP ($12 \mu\text{M.s}^{-1}$) and the ICDH ($10 \mu\text{M.s}^{-1}$), with G3PDH making a smaller contribution (Fig. 9A, left). When CAT was removed, flux through the ascorbate-glutathione pathway increased to $103 \mu\text{M H}_2\text{O}_2.\text{s}^{-1}$ (Fig. 4A, right). In this oxidative stress condition, in which FNR was held constant at $16 \mu\text{M.s}^{-1}$, the remaining flux of $87 \mu\text{M.s}^{-1}$ was shared between the three other NADPH-producing pathways (Fig. 8, top, second panel from left). As a result, all three showed a significant increase in flux compared to the +CAT condition, with the biggest relative increases observed for the OPPP (4.75-fold) and the G3PDH (4-fold). Removing ICDH, G3PDH, or both increased the flux through the OPPP until this pathway was supporting all of the flux apart from the basal contribution from FNR (Fig. 9A, extreme right).

How does the total cell glutathione respond in these different conditions? In the +CAT condition, glutathione remains very highly reduced (Fig. 9B, left). Although substantially more oxidized when CAT is removed, the combined action of the NADPH-producing pathways, together with the relatively high NADP(H) concentration (compared to conditions for Fig. 5) allow glutathione to remain 84% reduced, thereby limiting the increase in total cell content. When the G3PDH, ICDH or both are removed, the reduction state falls and total cell glutathione increases (Fig. 9B, right three panels). When only the OPPP accompanies FNR in supplying

TABLE 2. MINIMUM VALUES OF TOTAL (NADPH+NADP⁺) REQUIRED TO ACHIEVE STABILITY IN THE MODEL IN THE PRESENCE OF DIFFERENT NADP-REGENERATING SYSTEMS

	+OPPP +G3PDH +ICDH	+OPPP +ICDH	+OPPP +G3PDH	+OPPP
NADPH + NADP ⁺ (μM)	42.5	47.5	60	80

The model was run at a PAR of 200 μmol.m⁻².s⁻¹ for 4 days with catalase capacity set to 0. Numbers in the table indicate, for each condition, the values below which GSH concentrations achieved negative values and metabolite pools failed to equilibrate.

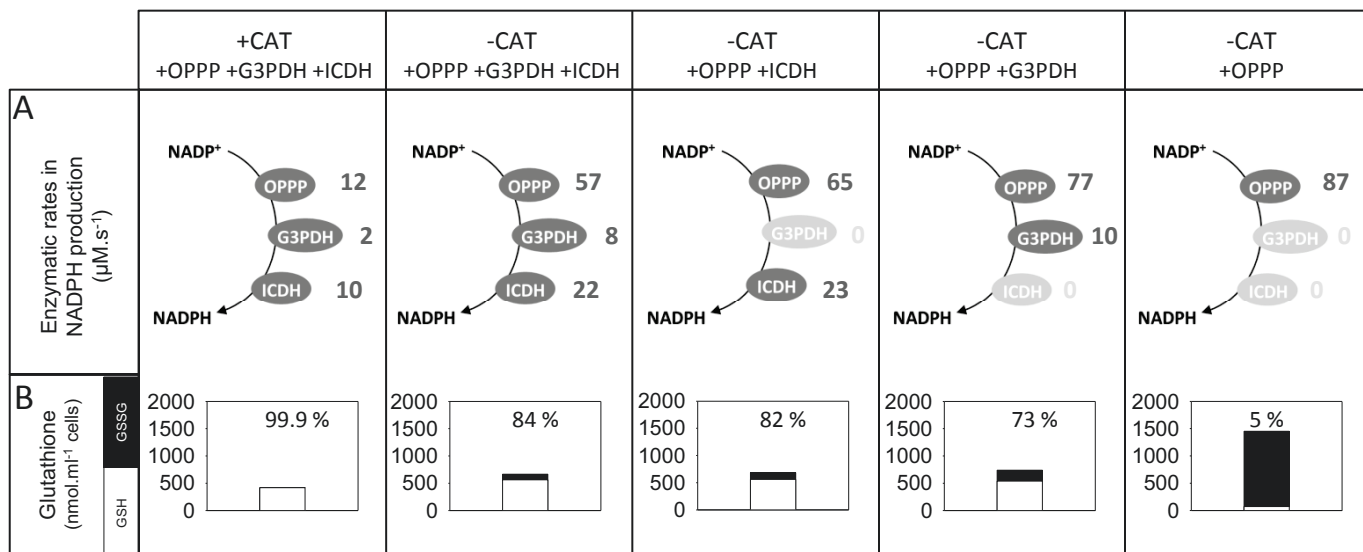


FIG. 9. Influence of NADP-linked dehydrogenases on the glutathione pool. The model was run at a catalase capacity of $150 \times 10^3 \mu\text{M.s}^{-1}$ (+CAT) or 0 (-CAT) as in Figure 5, right panels, and the effect of removing selected dehydrogenase activities was analyzed in the -CAT condition. Values correspond to the 84h time-point (middle of fourth day). **(A)** Schemes and rates of NADPH production by the three systems under the different conditions. OPPP, oxidative pentose phosphate pathway; G3PDH, cytosolic NADP-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; ICDH, isocitrate dehydrogenase. Values are in $\mu\text{M.s}^{-1}$. Note that the OPPP includes two NADPH-producing reactions. **(B)** Total cellular GSH and GSSG contents in the different conditions. White bars, GSH. Black bars, GSSG. The numbers indicate the % reduction state ($100 \times \text{GSH}/(\text{GSH} + 2 \text{GSSG})$). A background contribution to NADPH production for H₂O₂ metabolism from FNR of $16 \mu\text{M.s}^{-1}$ was included in the model. Total NADPH pool size was set to 80 μM (see Table 2). At lower values, the OPPP pathway and FNR were insufficient to deal with the demand for H₂O₂ processing and the different metabolite pools did not equilibrate. The effects of removing the OPPP pathway could not be examined because this led to insufficient NADPH-producing capacity for H₂O₂ removal.

reductant to support MDHAR and GR, the glutathione reduction state falls very low and GSSG reaches very high levels. While this analysis is obviously not comprehensive, the results are consistent with the notions that (i) multiple pathways of NADPH generation support metabolic robustness and (ii) that removing one or more can lead to perturbations of the glutathione pool, particularly in oxidative stress conditions. More analyses are required to investigate this point further, but the results are consistent with observations for *Arabidopsis icdh* mutants (91). In these mutants, the glutathione status is not significantly perturbed compared to the wild-type when the plants are in optimal growth conditions. However, in double *cat2 icdh* mutants, the accumulation of GSSG is more substantial than in the single *cat2* mutant (91), consistent with results shown in Fig. 9B.

Concluding remarks and perspectives

We have attempted to describe an aid to understanding by reporting a kinetic model to simulate processing of H_2O_2 produced mainly by photorespiration, a well-characterized metabolic pathway that is important in most plants, including most crop species. Ideally, modelling involves a quantitative examination of the multitude of reported data and interactions characteristic of biological systems, allowing for an integrated view of disperse data (52,145). Gaps in our knowledge and in the availability of data mean that models are, necessarily, simplifications of a more complex reality, but they are useful for the analysis of relationships that are difficult for the human brain to compute. Our model couples H_2O_2 metabolism to its light-dependent generation by integrating several processes (photorespiration, catalase, ascorbate-glutathione redox turnover, glutathione synthesis and vacuolar sequestration, NADPH generation). The components involved in these processes were parametrized using available literature data in order to meet the constraints of responses of ascorbate and glutathione status in wild-type and catalase-deficient plants.

The model succeeds in simulating experimental results observed in these systems for leaf ascorbate and glutathione redox status and contents. From the sensitivity analysis of configurations required to achieve an accurate simulation, the following implications can be derived. First, in unstressed conditions, CAT and the ascorbate-glutathione pathway can maintain H_2O_2 at very low levels. Second, at moderate rates of flux through the pathway, ascorbate redox turnover can be performed largely by a closed APX-MDHAR circuit that does not require glutathione. Third, even in the absence of CAT, the ascorbate-glutathione pathway is able to deal with relatively high rates of H_2O_2 production but this requires substantial redox engagement of glutathione. Fourth, redox activation of glutathione synthesis and vacuolar sequestration of GSSG are both required to reproduce real-world effects observed in the oxidative stress model *Arabidopsis* mutant, *cat2*. Fifth, MDHAR seems to play an important role in determining the degree of coupling between ascorbate and glutathione. Finally, accumulation of GSSG is inversely related to NADPH availability through an effect on MDHAR, not GR. Interestingly, if NADPH is non-limiting for MDHAR, the influence of CAT is predicted to be minor, ie, glutathione status is similar whether CAT is active or not. Conversely, NADPH that strongly limits MDHAR aggravates oxidation of glutathione when CAT is absent.

Several important additional factors could be incorporated into future versions of the model. Perhaps the most important would be a fuller description of the complex plant antioxidative system, and an improved

parametrization of subcellular compartmentation. Among the former could be incorporation of enzymes such as PRX (67), chemical oxidation of ascorbate and glutathione by ROS such as superoxide (112), the role of NADPH oxidases (140), and the inclusion of NAD redox turnover. Unfortunately, some of these processes would be either quite complex to model (NADH redox turnover) or else are not well characterized at the enzymatic level (NADPH oxidases). Nevertheless, introducing NADH turnover could be important to verify the influence of NADPH limitation of MDHAR. Some isoforms of MDHAR can also use NADH with high affinity, even if we note that NADH concentrations are considered to be very low in the cytosol (51), which was the main compartment considered here in terms of enzyme parametrization. Regarding compartmentation, our knowledge is currently limited by a lack of available data on transporter affinities and capacities, making it difficult to model subcellular movement of the small compounds considered in our model (H_2O_2 , ascorbate, glutathione, NADPH). Although we did use published data on affinities for GSSG (74) to introduce transport into the vacuole, the capacity of the ABCC-type transporters had to be empirically derived because literature data that allow realistic estimations are lacking. A further difficulty arises concerning the distribution of enzymes between compartments. In terms of differences in the kinetic properties of specific enzyme isoforms, it was necessary to make a strategic choice between the data available for purified enzymes. Where possible we used data available for the cytosolic isoforms since evidence suggests that this compartment is particularly important in redox signaling (17,96,122,136) and in metabolizing any photorespiratory H_2O_2 that escapes catalase (89,117,118,152).

Despite this complexity, and the possibility of GSH oxidation by processes that we have not yet incorporated into the model, our analysis does add weight to the notion that glutathione is exquisitely situated to act as a sensor of enhanced ROS production. The glutathione redox system can influence protein function through several mechanisms (14,28,159) but the plant cell may be configured so that the system only becomes substantially redox-engaged during oxidative stress. Our analysis suggests that when CAT and APX are both active, even quite high rates of basal H_2O_2 production may not engage the glutathione system to any great extent. In these conditions, the ascorbate redox system turns over with only a very minor input from glutathione. In conditions when additional H_2O_2 production is occurring, or CAT is down-regulated – both of which can occur in response to stress (90,140) – glutathione becomes much more engaged. The low redox potential of glutathione in the absence of stress adds to this sensitivity (86), because accumulation of GSSG to concentrations that are still quite low in absolute terms can cause large changes in the redox potential. Because the GSH:GSSG ratio is so high in optimal conditions, a stress-induced decrease in GSH:GSSG to values as high as 20 involves a large positive change in the redox potential. The marked increase in extracellular GSSG, from $0.07\ \mu\text{M}$ when CAT is functional to $116\ \mu\text{M}$ in the absence of CAT, contrasts with the much more modest increase in H_2O_2 itself. This was calculated to be 4.3-fold if APX capacity was unchanged: if APX is induced, as observed in catalase-deficient plants (about 2-fold: 89,117), the whole-cell H_2O_2 concentration would only increase from 1 to $1.4\ \mu\text{M}$ (Table 1). This may explain the difficulty of measuring sustained increases in H_2O_2 in catalase-deficient lines, in contrast to the marked and reproducible accumulation of GSSG (12,13,113).

Even discounting the vacuolar GSSG pool, the 1600-fold increase in GSSG in the -CAT condition underscores the potential value of modified glutathione status as a signal for enhanced H_2O_2 availability. Indeed, our model incorporates one sensor of changes in the glutathione redox potential, since we coupled γ -ECS activation to this

factor. This was done using an empirical parametrization (midpoint potential of -220 mV for 50% activation) that configured the regulation of γ -ECS so that the model was able to output realistic responses in glutathione status in both optimal and oxidative stress conditions. The existence of other similarly redox-sensitive proteins would allow the glutathione redox potential to be sensed by the cell to initiate other responses, such as transcriptional regulation. Other signaling components that could be affected by modified glutathione status include nitric oxide, through effects on GSNO availability. The fate of the GSSG that is transported into the vacuole, presumably to offset to some extent changes in the cytosolic glutathione redox potential, is a point that could be addressed in future versions of the model through the incorporation of the transpeptidases that initiate GSSG degradation (42,77). This recycling process could be important in supplying substrates to glutathione (re)synthesis, particularly as our model suggests that Cys availability may have an influence not only on glutathione contents but also on redox state.

Acknowledgments

M-S.R wishes to thank the Doctoral School ED129 “Sciences de l’Environnement d’Ile de France” for the kind award of a Bourse Ministérielle (PhD studentship). This work received financial support from the Agence Nationale de la Recherche grants ANR08VULN012 (Vulnoz) to A.T. and G.N. and ANR12BSV60011 (Cynthiol) to G.N.

References

1. Aller I, Rouhier N and Meyer A. Development of roGFP2-derived redox probes for measurement of the glutathione redox potential in the cytosol of severely glutathione-deficient *rm11* seedlings. *Front Plant Sci* 4: 506, 2013.
2. Apel K and Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373–399, 2004.
3. Attacha S, Solbach D, Bela K, Moseler A, Wagner S, Schwarzländer M, Aller I, Müller SJ, and Meyer AJ. Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane surfaces in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 40: 1281–1295, 2017.
4. Awad J, Stotz HU, Fekete A, Krischke M, Engert C, Havaux M, Berger S, and Mueller MJ. 2-Cys peroxiredoxins and thylakoid ascorbate peroxidase create a water-water cycle that is essential to protect the photosynthetic apparatus under high light stress conditions. *Plant Physiol* 167: 1592–1603, 2015.
5. Bick JA, Setterdahl AT, Knaff DB, Chen Y, Pitcher LH, Zilinskas BA, and Leustek T. Regulation of the plant-type 5'-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress. *Biochemistry* 40: 9040–9048, 2001.
6. Bienert GP, Schjoerring JK, and Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1758: 994–1003, 2006.
7. Bloem E, Haneklaus S, Salac I, Wickenhäuser P, and Schnug E. Facts and fiction about sulphur metabolism in relation to plant-pathogen interactions. *Plant Biol* 9: 596–607, 2007.
8. Bloem E, Riemenschneider A, Volker J, Papenbrock J, Schmidt A, Salac I, Haneklaus S, and Schnug E. Sulphur supply and infection with *Pyrenopeziza brassicae* influence L-cysteine desulphydrase activity in *Brassica napus* L. *J Exp Bot* 55: 2305–2312, 2004.
9. Boo YC and Jung J. Water deficit- induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. *J Plant Physiol* 155: 255–261, 1999.
10. Bratt A, Rosenwasser S, Meyer A, and Fluhr R. Organelle redox autonomy during environmental stress. *Plant Cell Environ* 39: 1909–1919, 2016.
11. Buwalda F, De Kok LJ, Stulen I, and Kuiper PJC. Cysteine, γ -glutamylcysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. *Physiol Plant* 74: 663–668, 1988.
12. Chaouch S, Queval G, and Noctor G. AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 69: 613–627, 2012.
13. Chaouch S, Queval G, Vanderauwera S, Mhamdi A, Vandenborgh M, Langlois-Meurinne M, Van Breusegem F, Saindrenan P, and Noctor G. Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 in a daylength-related manner. *Plant Physiol* 153: 1692–1705, 2010.
14. Chardonnet S, Sakr S, Cassier-Chauvat C, Le Maréchal P, Chauvat F, Lemaire SD, and Decottignies P. First proteomic study of S-glutathionylation in cyanobacteria. *J Proteome Res* 14: 59–71, 2015.

15. Chew O, Whelan J, and Millar AH. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J Biol Chem* 278: 46869–46877, 2003.
16. Dar TA, Uddin M, Khan MMA, Hakeem KR, and Jaleel H. Jasmonates counter plant stress: a review. *Environ Exp Bot* 115: 49–57, 2015.
17. Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, and Mittler R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell* 17:268–281, 2005.
18. Debnam PM, Fernie AR, Leisse A, Golding A, Bowsher CG, Grimshaw C, Knight JS, and Emes MJ. Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. *Plant J* 38: 49–59, 2004.
19. Del Río LA. ROS and RNS in plant physiology: an overview. *J Exp Bot* 66: 2827–2837, 2015.
20. Dghim AA, Mhamdi A, Vaultier MN, Hasenfratz-Sauder MP, LE Thiec D, Dizengremel P, Noctor G, and Jolivet Y. Analysis of cytosolic isocitrate dehydrogenase and glutathione reductase 1 in photoperiod-influenced responses to ozone using Arabidopsis knockout mutants. *Plant Cell Environ* 36: 1981–1991, 2013.
21. Dietz KJ and Hell R. Thiol regulation networks in the chloroplast. *Biol Chem* 396: 483–494, 2015.
22. Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, and Smirnoff N. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J* 52: 673–689, 2007.
23. Edwards R, Blount JW, and Dixon RA. Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures. *Planta* 184: 403–409, 1991.
24. Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Shibahara T, Inanaga S, and Tanaka K. Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* 225: 1255–1264, 2007.
25. Esposito-Rodriguez M, Laissue PP, Yvon-Durocher G, Smirnoff N, and Mullineaux PM. Photosynthesis-dependent H₂O₂ transfer from chloroplasts to nuclei provides a high-light signalling mechanism. *Nat Commun* 8: 49, 2017.
26. Farquhar GD and von Caemmerer S. Modeling of photosynthetic responses to environmental conditions. In: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 549–587, 1982.
27. Farquhar GD, von Caemmerer S, and Berry JA. A biochemical model of photosynthetic carbon dioxide assimilation in leaves of 3-carbon pathway species. *Planta* 149: 78–90, 1980.
28. Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang Y, Pallas JA, and Loake GJ. A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8054–8059, 2005.
29. Fischer BB, Hideg E, and Krieger-Liszkay A. Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxid Redox Signal* 18: 2145–2162, 2013.

30. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, and Dolan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442–446, 2003.
31. Foyer CH and Halliwell B. Purification and properties of dehydroascorbate reductase from Spinach leaves. *Phytochemistry* 16: 1347–1350, 1977.
32. Foyer CH and Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25, 1976.
33. Foyer CH and Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* 155: 2–18, 2011.
34. Foyer CH and Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal* 11: 861–905, 2009.
35. Foyer CH and Noctor G. Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect? *Plant Cell Environ* 39: 951–964, 2016.
36. Gao X, Yuan HM, Hu YQ, Li J, and Lu YT. Mutation of Arabidopsis CATALASE2 results in hyponastic leaves by changes of auxin levels. *Plant Cell Environ* 37: 175–188, 2014.
37. Gapper C and Dolan L. Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol* 141: 341–345, 2006.
38. Gatzek S, Wheeler GL, and Smirnoff N. Antisense suppression of l-galactose dehydrogenase in Arabidopsis thaliana provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated l-galactose synthesis. *Plant J* 30: 541–553, 2002.
39. Gomez L, Vanacker H, Buchner P, Noctor G, and Foyer CH. The intercellular distribution of glutathione synthesis and its response to chilling in maize. *Plant Physiol* 134: 1662–1671, 2004.
40. Grace SC and Logan BA. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiol* 112: 1631–1640, 1996.
41. Griffith OW and Mulcahy RT. The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol Biol* 73: 209–267, 1999.
42. Grzam A, Martin MN, Hell R, and Meyer AJ. γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *FEBS Lett* 581: 3131–3138, 2007.
43. Güllner G, Tóbiás I, Fodor J, and Kömives T. Elevation of glutathione level and activation of glutathione-related enzymes affect virus infection in tobacco. *Free Radic Res* 31(Suppl.), S155–S161, 1999.
44. Gutscher M, Sobotta MC, Wabnitz GH, Ballikaya S, Meyer AJ, Samstag Y and Dick TP. Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases. *J Biol Chem* 284: 31532–31540, 2009.
45. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16:33–50, 1996.
46. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neuro Chem* 97: 1634–1658, 2006.
47. Han Y, Chaouch S, Mhamdi A, Queval G, Zechmann B, and Noctor G. Functional analysis of Arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H₂O₂ to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxid Redox Signal* 18: 2106–2121, 2013a.

48. Han Y, Mhamdi A, Chaouch S, and Noctor G. Regulation of basal and oxidative stress-triggered jasmonic acid-related gene expression by glutathione. *Plant Cell Environ* 36: 1135–1146, 2013b.
49. Harada E, Yamaguchi Y, Koizumi N, and Hiroshi S. Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in Arabidopsis. *J Plant Physiol* 159: 445–448, 2002.
50. Harms K, von Ballmoos P, Brunold C, Hofgen R, and Hesse H. Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. *Plant J* 22: 335–343, 2000.
51. Heineke D, Riens B, Grosse H, Hoferichter P, Peter U, Flügge UI, and Heldt HW. Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. *Plant Physiol* 95: 1131–1137, 1991.
52. Heinrich R, Rapoport SM, and Rapoport TA. Metabolic regulation and mathematical models. *Prog Biophys Mol Biol* 32: 1–82, 1977.
53. Hell R and Bergmann L. γ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* 180: 603–612, 1990.
54. Hicks LM, Cahoon RE, Bonner ER, Rivard RS, Sheffield J, and Jez JM. Thiol-based regulation of redox-active glutamate-cysteine ligase from Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 19: 2653–2661, 2007.
55. Hossain MA and Asada K. Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J Biol Chem* 260: 12920–12926, 1985.
56. Iqbal A, Yabuta Y, Takeda T, Nakano Y, and Shigeoka S. Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of Arabidopsis thaliana. *FEBS J* 273: 5589–5597, 2006.
57. Ishikawa T and Shigeoka S. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 1143–1154, 2008.
58. Jez JM, Cahoon RE, and Chen S. Arabidopsis thaliana glutamate-cysteine ligase: Functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. *J Biol Chem* 279: 33463–33470, 2004.
59. Jiang G, Wang Z, Shang H, Yang W, Hu Z, Phillips J, and Deng X. Proteome analysis of leaves from the resurrection plant Boea hygrometrica in response to dehydration and rehydration. *Planta* 225: 1405–1420, 2007.
60. Jiménez A, Hernández JA, Pastori G, del Río LA, and Sevilla F. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol* 118: 1327–1335, 1998.
61. Johnston EJ, Rylott EL, Beynon E, Lorenz A, Chechik V, and Bruce NC. Monodehydroascorbate reductase mediates TNT toxicity in plants. *Science* 349: 1072–1075, 2015.
62. Jubany-Mari T, Alegre-Batlle L, Jiang K and Feldman LJ. Use of a redox-sensing GFP (c-roGFP1) for real-time monitoring of cytosol redox status in Arabidopsis thaliana water-stressed plants. *FEBS Lett* 584, 889–897, 2010.
63. Kerchev P, Waszczak C, Lewandowska A, Willems P, Shapiguzov A, Li Z, Alseekh S, Mühlenbock P, Hoeberichts FA, Huang J, Van Der Kelen K, Kangasjärvi J, Fernie AR, De Smet R, Van de Peer Y, Messens J, and Van Breusegem F. Lack of GLYCOLATE OXIDASE1, but not GLYCOLATE OXIDASE2, attenuates the photorespiratory phenotype of CATALASE2-deficient Arabidopsis. *Plant Physiol* 171:1704–1719, 2016.

64. Keys AJ. Biochemistry of photorespiration and the consequences for plant performance. In *Plant Carbohydrate Biochemistry* (eds J.A. Bryant, M.M. Burrell, N.J. Kruger). pp. 147–161. BIOS Scientific, Oxford, UK, 1999.
65. Klein M, Burla B, and Martinoia E. The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Lett* 580: 1112–1122, 2006.
66. Koffler BE, Maier R, and Zechmann B. Subcellular distribution of glutathione precursors in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol* 53: 930–941, 2011.
67. König J, Baier M, Horling F, Kahmann U, Harris G, Schürmann P, and Dietz KJ. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5738–5743, 2002.
68. Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, and Pieterse CMJ. Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* 147: 1358–1368, 2008.
69. Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev V, and Mittler R. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *J Biol Chem* 283: 34197–34203, 2008.
70. Kranner I, Birtic S, Anderson KM, and Pritchard HW. Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death. *Free Rad Biol Med* 40: 2155–2165, 2006.
71. Leterrier M, Barroso JB, Palma JM, and Corpas FJ. Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase in *Arabidopsis* leaves and roots. *Biol Plant* 56: 705–710, 2012.
72. Leterrier M, del Río LA, and Corpas FJ. Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase of pea plants: genomic clone characterization and functional analysis under abiotic stress conditions. *Free Radic Res* 41: 191–199, 2007.
73. Li S, Mhamdi A, Clement C, Jolivet Y, and Noctor G. Analysis of knockout mutants suggests that *Arabidopsis* NADP-MALIC ENZYME2 does not play an essential role in responses to oxidative stress of intracellular or extracellular origin. *J Exp Bot* 64: 3605–3614, 2013.
74. Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hortensteiner S, Martinoia E, and Rea PA. AtMRP2, and *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant cell* 10: 267–282, 1998.
75. Maheshwari R and Dubey RS. Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defense in rice seedlings. *Plant Growth Regul* 59: 37–49, 2009.
76. Marino D, Frendo P, González EM, Puppo A, and Arrese-Igor C. NADPH recycling systems in oxidative stressed nodules: a key role for the NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Planta* 225: 413–421, 2007.
77. Martin MN, Saladores PH, Lambert E, Hudson AO, and Leustek T. Localization of members of the γ -glutamyl transpeptidase family identifies sites of glutathione and glutathione S-conjugate hydrolysis. *Plant Physiol* 144: 1715–1732, 2007.

78. Maruta T, Noshi M, Tanouchi A, Tamoi M, Yabuta Y, Yoshimura K, Ishikawa T, and Shigeoka S. H₂O₂-triggered retrograde signalling from chloroplasts to nucleus plays specific role in response to stress. *J Biol Chem* 287: 11717–11729, 2012.
79. Masaaki N, Maiko S, Nakamura M, Aono M, Saji H, and Saito K. Cysteine synthase overexpression in tobacco confers tolerance to sulfur-containing environmental pollutants. *Plant Physiol* 126: 973–980, 2001.
80. Maughan SC, Pasternak M, Cairns N, Kiddle G, Brach T, Jarvis R, Haas F, Nieuwland J, Lim B, Müller C, Salcedo-Sora E, Kruse C, Orsel M, Hell R, Miller AJ, Bray P, Foyer CH, Murray JA, Meyer AJ, and Cobbett CS. Plant homologs of the Plasmodium falciparum chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2331–2336, 2010.
81. May MJ and Leaver CJ. Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol* 103: 621–627, 1993.
82. May MJ, Parker JE, Daniels MJ, Leaver CJ, and Cobbett CS. An *Arabidopsis* mutant depleted in glutathione shows unaltered responses to fungal and bacterial pathogens. *Mol Plant Microb Int* 9: 349–356, 1996.
83. Meister A. Glutathione biosynthesis and its inhibition. *Meth Enzymol* 252: 26–39, 1995.
84. Mendoza-Cozatl D, Devars S, Loza-Tavera H, and Moreno-Sánchez R. Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol Plant* 115: 276–283, 2002.
85. Meyer AJ. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J Plant Physiol* 165: 1390–1403, 2008.
86. Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, and Hell R. Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J* 52: 973–986, 2007.
87. Mhamdi A and Noctor G. Analysis of the roles of the *Arabidopsis* peroxisomal isocitrate dehydrogenase in leaf metabolism and oxidative stress. *Environ Exp Bot* 114: 22–29, 2015.
88. Mhamdi A and Noctor G. High CO₂ primes plant biotic stress defences through redox-linked pathways. *Plant Physiol* 172: 929–942, 2016.
89. Mhamdi A, Hager J, Chaouch S, Queval G, Han Y, Taconnat L, Saindrenan P, Gouia H, Issakidis-Bourguet E, Renou JP, and Noctor G. *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE 1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular H₂O₂ and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol* 153: 1144–1160, 2010a.
90. Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, and Noctor G. Catalases in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61: 4197–4220, 2010b.
91. Mhamdi A, Mauve C, Gouia H, Saindrenan P, Hodges M, and Noctor G. Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Environ* 33: 1112–1123, 2010c.
92. Minard KI and McAlister-Henn L. Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. *Free Radic Biol Med* 31: 832–843, 2001.

93. Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, and Van Breusegem F. ROS signalling: the new wave? *Trends Plant Sci* 16: 300–309, 2011.
94. Miyaji T, Kuromori T, Takeuchi Y, Yamaji N, Yokosho K, Shimazawa A, Sugimoto E, Omote H, Ma JF, Shinozaki K, and Moriyama Y. AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 6: 5928, 2014.
95. Miyake C and Asada K. Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol* 35: 539–549, 1994.
96. Mou Z, Fan W, and Dong X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935–944, 2003.
97. Müller-Moulé P, Conklin PL, and Niyogi KK. Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiol* 128: 970–977, 2002.
98. Narendra S, Venkataramani S, Shen G, Wang J, Pasapula V, Lin Y, Korniyev D, Holaday AS, and Zhang H. The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development. *J Exp Bot* 57: 3033–3042, 2006.
99. Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP, and Rouhier N. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stress. *Plant Physiol* 142: 1364–1379, 2006.
100. Noctor G and Foyer CH. Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiol* 171: 1581–1592, 2016.
101. Noctor G, Lelarge-Trouverie C, and Mhamdi A. The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry* 112: 33–53, 2015.
102. Noctor G, Mhamdi A, and Foyer CH. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant Cell Environ* 39: 1140–1160, 2016.
103. Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, and Foyer CH. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ* 35: 454–484, 2012.
104. Noctor G, Mhamdi A, Queval G, and Foyer CH. Regulating the redox gatekeeper: vacuolar sequestration puts glutathione disulfide in its place. *Plant Physiol* 163: 665–671, 2013.
105. Noctor G, Veljovic-Jovanovic SD, Driscoll S, Novitskaya L, and Foyer CH. Drought and oxidative load in the leaves of C_3 plants : a predominant role for photorespiration? *Ann Bot (Lond)* 89: 841–850, 2002.
106. Noji M and Saito K. Molecular and biochemical analysis of serine acetyltransferase and cysteine synthase towards sulphur metabolic engineering in plants. *Amino Acids* 22: 231–243, 2002.
107. O’Brien JA, Daudi A, Butt VS, and Bolwell GP. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236: 765–779, 2012a.
108. O’Brien JA, Daudi A, Finch P, Butt VS, Whitelegge JP, Souda P, Ausubel FM and Bolwell GP. A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiol* 158: 2013–2027, 2012b.
109. Parsons HT and Fry SC. Oxidation of dehydroascorbic acid and 2,3-diketogulonate under plant apoplastic conditions. *Phytochemistry* 75: 41–49, 2012.

110. Parsons HT, Yasmin T, and Fry SC. Alternative pathways of dehydroascorbic acid degradation in vitro and in plant cell cultures: novel insights into vitamin C catabolism. *Biochem J* 440: 375–383, 2011.
111. Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, and Mittler R. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant J* 34: 187–203, 2003.
112. Polle A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol* 126: 445–462, 2001.
113. Queval G, Issakidis-Bourguet E, Hoeberichts FA, Vandenabeele M, Gakière B, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Van Breusegem F, and Noctor G. Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *Plant J* 52: 640–657, 2007.
114. Queval G, Hager J, Gakière B, and Noctor G. Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in quantitative assays of leaf extracts. *J Exp Bot* 59: 135–146, 2008.
115. Queval G, Jaillard D, Zechmann B, and Noctor G. Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ* 34: 21–32, 2011.
116. Queval G, Thominet D, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Gakière B, and Noctor G. H₂O₂-activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Molecular Plant* 2: 344–356, 2009.
117. Rahantaniaina MS, Li S, Chatel-Innocenti G, Tuzet A, ElIssakidis-Bourguet E, Mhamdi A, and Noctor G. Cytosolic and chloroplastic DHARs cooperate in oxidative stress-driven activation of the salicylic acid pathway. *Plant Physiol* 174: 956–971, 2017a.
118. Rahantaniaina MS, Li S, Chatel-Innocenti G, Tuzet A, Mhamdi A, Vanacker H, and Noctor G. Glutathione oxidation in response to intracellular H₂O₂: key but overlapping roles for dehydroascorbate reductases. *Plant Signal Behav* 12, e1356531, 2017b.
119. Rahantaniaina MS, Tuzet A, Mhamdi A, and Noctor G. Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants? *Front Plant Sci* 4:477, 2013.
120. Rea PA. Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* 58: 347–375, 2007.
121. Rius SP, Casati P, Iglesias AA, and Gomez-Casati DF. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant lacking a cytosolic non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Mol Biol* 61: 945–957, 2006.
122. Rochon A, Boyle P, Wignes T, Fobert PR, and Després C. The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* 18: 3670–3685, 2006.
123. Sarry JE, Kuhn L, Ducruix C, Lafaye A, Junot C, Hugouvieux V, Jourdain A, Bastien O, Fievet JB, Vaillhen D, Amekraz B, Moulin C, Ezan E, Garin J, and Bourguignon J. The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* 6: 2180–2198, 2006.

124. Schäfer L and Feierabend J. Photoinactivation and protection of glycolate oxidase in vitro and in leaves. *Z Naturf* 55: 361–372, 2000.
125. Schwarzländer M, Fricker M, Müller C, Marty L, Brach T, Novak T, Sweetlove LJ, Hell R, and Meyer AJ. Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J Microsc* 231: 299–316, 2008.
126. Schwarzländer M, Logan DC, Fricker MD, and Sweetlove LJ. The circularly permuted yellow fluorescent protein cpYFP that has been used as a superoxide probe is highly responsive to pH but not superoxide in mitochondria: implications for the existence of superoxide 'flashes'. *Biochem J* 437: 381–387, 2011.
127. Sen Gupta A, Alscher RG, and Cune D. Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiol* 96: 650–655, 1991.
128. Sharkey TD. Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiol Plant* 73: 147–152, 1988.
129. Sharma P and Dubey RS. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regul* 46: 209–221, 2005.
130. Sharma P and Dubey RS. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Rep* 26: 2027–2038, 2007.
131. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* 11: 613–619, 2017.
132. Smirnoff N. Vitamin C: the metabolism and functions of ascorbic acid in plants. *Adv Bot Res* 59: 107–177, 2011.
133. Smith IK, Kendall AC, Keys AJ, Turner JC, and Lea PJ. Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci Lett* 37: 29–33, 1984.
134. Smykowski A, Zimmermann P, and Zentgraf U. G-box binding factor1 reduces CATALASE2 expression and regulates the onset of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 153: 1321–1331, 2010.
135. Stevens R, Page D, Gouble B, Garchery C, Zamir D, and Causse. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant Cell Environ* 31: 1086–1096, 2008.
136. Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, and Dong X. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952–956, 2008.
137. Tognetti VB, Van Aken O, Morreel K, Vandenbroucke K, Van de Cotte B, De Clercq I, Chiwocha S, Fenske R, Prinsen E, Boerjan W, Genty B, Stubbs KA, Inzé D, and Van Breusegem F. Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance. *Plant Cell* 22: 2660–79, 2010.
138. Tommasini R, Martinoia E, Grill E, Dietz K-J, and Amrhein N. Transport of oxidized glutathione into barley vacuoles: evidence for the involvement of the glutathione-S-conjugate ATPase. *Z Naturf* 48c: 867–871, 1993.

139. Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hörtensteiner S, Matile P, Amrhein N, and Martinoia E. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J* 13: 773–780, 1998.
140. Torres MA, Jones JD, and Dangl JL. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 37: 1130–1134, 2005.
141. Tripathi BN, Bhatt I, and Dietz KJ. Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma* 235: 3–15, 2009.
142. Tsukagoshi H, Busch W, and Benfey PN. Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143: 606–616, 2010.
143. Tuzet A, Granier A, Betsch P, Peiffer M, and Perrier A. Modelling hydraulic functioning of an adult beech stand under non-limiting soil water and severe drought condition. *Ecol Model* 348: 56–77, 2017.
144. Tuzet A, Perrier A, and Leuning R. A coupled model of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration. *Plant Cell Environ* 26: 1097–1116, 2003.
145. Tuzet A, Perrier A, Loubet B, and Cellier P. Modelling ozone deposition fluxes: The relative roles of deposition and detoxification processes. *Agricult Forest Meteorol* 151: 480–492, 2011.
146. Vainonen JP and Kangasjärvi, J. Plant signalling in acute ozone exposure. *Plant Cell Environ* 38: 240–252, 2015
147. Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gómez-Rodríguez MV, Chaki M, Pedrajas JR, Fernández-Ocaña A, Del Río LA, and Barroso JB. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell Environ* 29: 1449–1459, 2006.
148. Valero E, González-Sánchez MI, Macià H, and García-Carmona F. Computer simulation of the dynamic behavior of the glutathione-ascorbate redox cycle in chloroplasts. *Plant Physiol* 149: 1958–1969, 2009.
149. Valero E, Macià H, Fuente I, Hernandez JA, Gonzales-Sanchez MI, and García-Carmona F. Modeling the ascorbate-glutathione cycle in chloroplasts under light/dark conditions. *BMC Systems Biol* 10: 11, 2016.
150. Vanacker H, Carver TL, and Foyer CH. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol* 123: 1289–1300, 2000.
151. Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylstecke M, Rombauts S, Langebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inzé D, and Van Breusegem F. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 39: 45–58, 2004.
152. Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Van de Cotte B, Morsa S, Ravanat JL, Hegie A, Triantaphylidès C, Shulaev V, Van Montagu MC, Van Breusegem F, and Mittler R. Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1711–1716, 2011.
153. Voll LM, Zell MB, Engelsdorf T, Saur A, Wheeler MG, Drincovich MF, Weber AP, and Maurino VG. Loss of cytosolic NADP-malic enzyme 2 in *Arabidopsis thaliana* is associated with enhanced susceptibility to *Colletotrichum higginsianum*. *New Phytol* 195: 189–202, 2012.
154. von Caemmerer. Biochemical Models of Leaf Photosynthesis, Vol 2. *CSIRO Publishing*, Collingwood, Australia, 2000.

155. Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, and Van Camp W. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C₃ plants. *EMBO J* 16: 4806–4816, 1997.
156. Wirtz M and Hell R. Dominant-negative modification reveals the regulatory function of the multimeric cysteine synthase protein complex in transgenic tobacco. *Plant Cell* 19: 625–639, 2007.
157. Xiang C and Oliver DJ. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* 10:1539–1550, 1998.
158. Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, and Shigeoka S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol* 123: 223–234, 2000.
159. Zaffagnini M, Bedhomme M, Lemaire SD, and Trost P. The emerging roles of protein glutathionylation in chloroplasts. *Plant Sci* 185–186: 86–96, 2012.
160. Zamocky M, Furtmüller PG, and Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal* 10: 1527–1548, 2008.
161. Zechmann B, Müller M, and Zellnig G. Modified levels of cysteine affect glutathione metabolism in plant cells. In *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants* (eds Khan NA, Singh S, and Umar S), 193–206, 2008.
162. Zechmann B, Zellnig G, Urbanek-Krajnc A, and Müller M. Artificial elevation of glutathione affects symptom development in ZYMV-infected *Cucurbita pepo* L. *plants Arch Virol* 152: 747–762, 2007.

Supplemental File 1. Details of the model

Modelling H_2O_2 production

H_2O_2 production by the glycolate oxidase (GOX) reaction was simulated using accepted models of photosynthesis and photorespiration (14, 15, 63). During the photorespiratory cycle, 0.5 mole of CO_2 is released for 1 mole of O_2 fixed and the rate of O_2 fixed can be calculated from the rate of photosynthesis and the ratio of RuBisCO oxygenation to carboxylation (Φ). According to the above models, the rate of net CO_2 assimilation (A) at given external conditions will depend on which factor is limiting between Rubisco (V_c), electron transport (V_j), and phosphate regeneration (V_p ; 63), and A is considered to be equal to the minimum rate produced by these three terms. Preliminary simulations using our model showed that V_j was always limiting up to and including the default irradiance ($200 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$). In this condition, A is related to V_j as follows:

$$(Eq. 1) \quad A + Rd = V_j = \frac{J}{4} \frac{c_i - \Gamma^*}{c_i + 2\Gamma^*}$$

where J is the electron transport rate for a given absorbed photon irradiance and J_{max} at saturating light is taken $95 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (66), Γ^* is the CO_2 compensation point in the absence of day respiration (37.4 ppm, 51), c_i is the intercellular CO_2 concentration, and Rd is the day respiration, which comprises mitochondrial CO_2 release occurring in the light other than that of photorespiration. Following De Pury and Farquhar (11), Rd is set equal to a fixed proportion of V_{cmax} , the maximum activity of RuBisCO ($Rd=0.0089 V_{cmax}$, with V_{cmax} taken as $60 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$; 66).

We combined the biochemical photosynthesis model with a semi-empirical stomatal conductance model (4, 55, 56) to estimate stomatal conductance and the photosynthesis rate of leaves simultaneously. The stomatal conductance is calculated as:

$$(Eq. 2) \quad g_{CO_2} = g_0 + \frac{a_g A}{c_i - \Gamma} f_{\psi_v}$$

where g_{CO_2} is stomatal conductance for CO_2 , g_0 is the residual conductance (limiting value of g_{CO_2} at the light compensation point), Γ is the CO_2 compensation point, a is an empirical constant equal to 2, f_{ψ_v} is an empirical function describing the sensitivity of stomata to leaf water potential. In our approach, where plants are always well supplied with water, f_{ψ_v} is always equal to 1. The intercellular CO_2 concentration is given, according to Fick's first law of diffusion for CO_2 transfer along the path c_a to c_i :

$$(Eq. 3) \quad c_i = c_a - \frac{A}{g_{CO_2}}$$

Eq1 to Eq3 are simultaneously solved to obtain A , c_i , and g_{CO_2} , as described previously by Baldocchi et al (3), and applied to our model. At an irradiance of $200 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$, steady-state values of A , c_i , g_{CO_2} were $7 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 288 ppm, and $62 \text{ mmol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectively, which are in a similar range to typical measured values in Arabidopsis leaves at moderate light (53, 62).

Based on the model proposed by Farquhar et al. (15), the rate of RuBP oxygenation is expressed as follows:

$$(Eq.4) \quad V_o = \frac{A + Rd}{\frac{1}{\Phi} - 0.5} \quad \text{with} \quad \Phi = \frac{2\Gamma^*}{c_i}$$

By application of these equations, V_o was obtained and was taken to represent the rate of H_2O_2 production by glycolate oxidase (GOX) according to $\text{RuBP} + \text{O}_2 = 3\text{-PGA} + 2\text{-phosphoglycolate (2-PG)}$; $2\text{-PG} + \text{H}_2\text{O} = \text{glycolate} + \text{phosphate}$; $\text{glycolate} + \text{O}_2 = \text{glyoxylate} + \text{H}_2\text{O}_2$.

In addition to GOX-dependent photorespiratory H_2O_2 production, two other sources were integrated into the model, to approximate likely physiological conditions. First, basal dark production of H_2O_2 through reactions such as the mitochondrial electron transport chain was assumed to correspond to about 10% of the light-dependent production. Second, because GOX activity is not the only light-dependent source of H_2O_2 , we also modeled a basal production of this oxidant from superoxide produced by the photosynthetic electron transport chain. For this, electron flow to superoxide was taken as 1.5% of the total modeled electron flux through the chain. Consequently, like GOX activity, chloroplast superoxide production was dependent on factors affecting the overall rate of photosynthesis. The total rate of H_2O_2 production from these three sources was denoted $V_{\text{H}_2\text{O}_2}$ in the model.

Modelling removal of H_2O_2

While several pathways can remove H_2O_2 , for reasons of simplicity and available data, we considered catalase and the ascorbate-glutathione pathway. Thus, H_2O_2 can be dismutated to O_2 and H_2O by catalase, or reduced to H_2O by ascorbate peroxidase (APX). Only the latter is dependent on cellular reductant, notably NADPH, whose production we included in the model.

Enzyme activities were modelled as described below using K_M and other kinetic characteristics taken from the literature (Supplementary Table S1). The physiologically relevant V_{max} , which is the maximum reaction velocity corresponding to the product of the k_{cat} (turnover number, i.e. the number of molecules of substrate which can be converted) and the concentration of enzymes, was replaced by V_{capacity} which was calculated for each enzyme by converting measured extractable activities (in moles per unit protein per min) to μM per s. Where possible, we used personal data obtained for Arabidopsis leaves (Supplementary Table S2). If not available, we used extractable activities reported in the literature for Arabidopsis or, if data were not available, for other plant species.

Catalases

The affinity of catalases for H_2O_2 is very low: apparent K_M -values between about 10 and 140 mM have been observed in plants (12, 48). The low affinity for H_2O_2 means that catalase activities increase almost linearly as H_2O_2 is increased, even to values that are clearly supra-physiological. Because of this property, accurate determination of the true K_M for H_2O_2 is difficult. The catalytic reaction does not follow Michaelis-Menten kinetics but instead pseudo-first-order kinetics, within the physiological range of H_2O_2 concentrations (19). In this case, the velocity becomes proportional to the substrate concentration. The reaction velocities were calculated according to Equation 5 as follows:

$$(Eq. 5) \quad V_{CAT} = V_{capacity\_CAT} \frac{[H_2O_2]}{K_M^{CAT-H_2O_2}}$$

Where $V_{capacity\_CAT}$ is given in Supplementary Table S2 and $K_M^{CAT-H_2O_2}$ in Supplementary Table S1.

Ascorbate- glutathione pathway

- **Ascorbate peroxidase (APX)**

In the ascorbate-glutathione pathway, H_2O_2 is reduced to H_2O by APX, an enzyme with a much higher affinity for H_2O_2 than CAT, leading to oxidation of ASC to MDHA. This enzyme is a class I heme peroxidase (67) whose catalytic mechanism is reminiscent of that observed in other peroxidases and involves the formation of an oxidized intermediate (compound I), which is subsequently reduced by substrate in two sequential, single-electron transfer steps. The flux through APX can be calculated by the ping-pong bi-bi reaction mechanism (6):

$$(Eq. 6) \quad V_{APX} = V_{capacity\_APX} \frac{[ASC][H_2O_2]}{K_M^{APX-H_2O_2}[ASC] + K_M^{APX-ASC}[H_2O_2] + [ASC][H_2O_2]}$$

- **Monodehydroascorbate reductase (MDHAR)**

MDHA can be reduced by NAD(P)H in a reaction catalyzed by MDHAR (21). To allow the importance of NADPH-generating enzymes to be modelled, we focused on NADPH-dependent MDHAR. The enzyme was introduced into the model using the previously described ping-pong mechanism (21),

$$(Eq. 7) \quad V_{MDHAR} = V_{capacity\_MDHAR} \frac{[MDHA][NADPH]}{K_M^{MDHAR-MDHA}[NADPH] + K_M^{MDHAR-NADPH}[MDHA] + [NADPH][MDHA]}$$

A second fate of MDHA is spontaneous disproportionation to ASC and DHA (5). This function was described as follows using the constant detailed in Supplementary Table S3:

$$(Eq. 8) \quad V_{MDHA\_dismutation} = K_{MDHA}[MDHA][MDHA]$$

- **Dehydroascorbate reductase (DHAR)**

DHAR catalyzes the reduction of DHA to ASC, with GSH as the electron donor, in a bi-uni-uni-uni ping-pong mechanism (50, 52). The binding of DHA to the free, reduced form of the enzyme is followed by the binding of GSH. We modelled this reaction according to a previously used equation (57, 58):

$$(Eq. 9) \quad V_{DHAR} = V_{capacity\_DHAR} \frac{[DHA][GSH]}{K + K_M^{DHAR\_DHA}[GSH] + K_M^{DHAR\_GSH}[DHA] + [DHA][GSH]}$$

With $K = K_i^{DHA}K_M^{GSH}$ and $K_M^{GSH} = K_M^{GSH1} + K_M^{GSH2}$

The first expression K_i^{DHA} is the equilibrium constant between DHA, DHAR, and the enzyme-substrate DHAR-DHA complex. K_M^{GSH1} and K_M^{GSH2} are the values of K_M for the first-binding and the second-binding molecules of GSH, respectively. The sum of these two K_M values has been grouped as K_M^{GSH} in the model, since it has not been possible to establish them separately in kinetic assays (52, 57, 58). In the model, these values were grouped into $K = 500 \mu M^2$ (57, 58).

In addition to DHAR, ASC can also be regenerated from DHA by GSH through a purely chemical reaction (39). This reaction was described as follows using the constant detailed in Supplementary Table S3:

$$(Eq. 10) \quad V_{GSH\_DHA} = K_{DHA,GSH}[GSH][DHA]$$

- **Glutathione reductase (GR)**

Recycling of GSH is achieved by reduction of GSSG catalyzed by GR, with consumption of NADPH. Kinetic studies performed with this enzyme have revealed a bi-ter ping-pong mechanism (60). The rate equation corresponding to this mechanism for the forward reaction is the following, used in our model:

$$(Eq. 11) \quad V_{GR} = V_{capacity\_GR} \frac{[GSSG][NADPH]}{K_M^{GR\_GSSG}[NADPH] + K_M^{GR\_NADPH}[GSSG] + [NADPH][GSSG]}$$

SUPPLEMENTARY TABLE S1. REACTIONS TAKEN INTO ACCOUNT IN H₂O₂-REMOVAL PATHWAYS AND KINETIC PARAMETERS USED IN THE MODEL

Enzyme					Michaelis-Menten constant		
	Substrates			Products	K _M (μM)		
	Reductant		Oxidant		Reductant	Oxidant	
CAT	H ₂ O ₂	+	H ₂ O ₂	→	2H ₂ O + O ₂	24 000 ¹	
APX	2ASC	+	H ₂ O ₂	→	2MDHA + 2H ₂ O	325 ³⁵	20 ³⁵
MDHAR	NADPH + H ⁺	+	2MDHA	→	2ASC + NADP ⁺	30 ⁷	0.9 ⁷
DHAR	2GSH	+	DHA	→	ASC + GSSG	2500 ²²	70 ²²
GR	NADPH + H ⁺	+	GSSG	→	2GSH + NADP ⁺	5 ¹⁷	50 ¹⁷

SUPPLEMENTARY TABLE S2. CONVERSION OF UNIT OF EXTRACTABLE ENZYME ACTIVITY ASSAYED ($V_{capacity}$) TO μM. s⁻¹

Enzyme	$V_{capacity, measured}$ (nmol.mg ⁻¹ prot.min ⁻¹)	$V_{capacity, converted}$ (μM s ⁻¹)*
CAT	180 000	150 000
APX	240	200
MDHAR	168	140
DHAR	120	100
GR	60	50

*For example, a GR activity in Arabidopsis leaves of 60 nmol.mg⁻¹prot.min⁻¹ is converted to μM.s⁻¹ as follows. Leaf protein content is about 10 mg.g⁻¹ FW. Assuming that the cellular volume is approximately 1 ml.g⁻¹FW, that the vacuole accounts for 80% of this volume, and that GR is not found in the vacuole, this activity converts to a $V_{capacity}$ of 60/60 x 10 nmoles in a volume of 200 μl = 50 μM s⁻¹.

SUPPLEMENTARY TABLE S3. CHEMICAL REACTIONS INTEGRATED INTO THE MODEL AND THEIR APPARENT BIMOLECULAR RATE CONSTANTS

Reaction	K (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Reference
MDHA + MDHA → DHA + ASC	3.10 ⁵	(2)
DHA + 2GSH → GSSG + ASC	1.10 ⁵	(18)

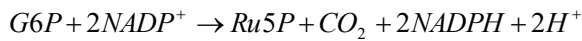
Regeneration of NADPH

While glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of the Benson-Calvin cycle is the major sink for NADPH produced in the chloroplast in the light, part of this NADPH could be used by other reactions that may be coupled to H₂O₂ removal through the ascorbate-glutathione pathway. Thus, alongside its major role in supplying reductant for the Benson-Calvin cycle, the chloroplast electron transport chain produces both oxidants (eg, superoxide) but also reductants that may contribute to processing these oxidants. This was built into the model by assuming that 1% of the total electron flow would be available for reduction of H₂O₂ produced in the light by photorespiration or by the electron transport chain via superoxide.

This additional factor defines chloroplast ferredoxin-NADP reductase (FNR) as a source of basal NADPH that can contribute to H₂O₂ metabolism. However, most of the H₂O₂ in the model is produced in the peroxisome. Moreover, studies of double and triple mutants have revealed that H₂O₂-metabolizing systems are important in

catalase-deficient plants (32, 33, 44, 45, 59). Thus, major NADP-dependent dehydrogenases were integrated into the model, and parametrized, where possible, using experimental data. The enzymes were isocitrate dehydrogenase (ICDH), the NADP-dependent cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), and the two dehydrogenases of the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP), ie, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6GPDH). Each enzyme was introduced into the model after taking into account its particular mechanism of action and regulation.

To model the OPPP, we considered G6PDH as the major control over flux, and compressed the two reactions into a single one, as follows:



G6PDH activity was modelled using an ordered bi-bi mechanism suggested previously in *Candida bodinii* and in *S. cerevisiae* (26, 61). Assuming that these kinetic mechanisms are also valid for plant G6PDH, and introducing a term to describe competitive inhibition by the product, NADPH (8, 9, 34), the rate equations then become:

$$(Eq. 12) \quad V_{OPPP} = V_{capacity_{OPPP}} \frac{[G6P][NADP^+]}{K_M^{G6P} K_M^{NADP^+} + K_M^{G6P} [NADP^+] + K_M^{NADP^+} [G6P] \left(1 + \frac{[NADPH]}{K_i}\right) + K_M^{G6P} K_M^{NADP^+} \frac{[NADPH]}{K_i} + [G6P][NADP^+]}$$

The glucose-6-phosphate concentration was taken as 5.9 mM (16, 68).

The ICDH enzymatic reaction consists of the oxidative decarboxylation of isocitrate to reduce $NADP^+$ to NADPH. The substrate is an isocitrate-metal ion complex that is initially oxidized, thus bringing about the reduction of $NADP^+$, and then decarboxylated to 2-oxoglutarate, thus liberating a molecule of CO_2 . ICDH exhibits Michaelis-Menten kinetics (10, 38, 69), and the rate equation introduced into the model was :

$$(Eq. 13) \quad V_{ICDH} = V_{capacity_{ICDH}} \frac{[isocitrate][NADP^+]}{K_M^{NADP^+} [isocitrate] + K_M^{isocitrate} [NADP^+] + [isocitrate][NADP^+]}$$

The isocitrate concentration was set as 65 μM .

In addition to the chloroplastic NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the classical glycolytic NAD-linked GAPDH in the cytosol, plants have a cytosolic non-phosphorylating NADP-G3PDH (27, 47). NADP-G3PDH has a random bi-bi mechanism reaction (23), and the rate equation used was as follows:

$$(Eq. 14) \quad V_{G3PDH} = V_{capacity_{G3PDH}} \frac{[G3P][NADP^+]}{K_M^{NADP^+} [G3P] + K_M^{G3P} [NADP^+] + [G3P][NADP^+]}$$

The glyceraldehyde 3-phosphate concentration was set as 35 μM .

SUPPLEMENTARY TABLE S4. REACTIONS TAKEN INTO ACCOUNT IN NADPH REGENERATION

Enzyme			
Reaction	Kinetic parameters	Unit	
G6PDH and 6PGDH were simplified as OPPP pathway:			
$G6P + 2NADP^+ \rightarrow Ru5P + CO_2 + 2NADPH + 2H^+$	$V_{capacity\_OPPP} = 75^{*13}$	$\mu M s^{-1}$	
	$K_M^{G6P} = 330^{49}$	μM	
	$K_{M\_1}^{NADP^+} = 19^{65}$	μM	
	$K_{i\_1}^{NADPH} = 70^{65}$	μM	
ICDH			
$isocitrate + NADP^+ \rightarrow 2-OG + CO_2 + NADPH + H^+$	$V_{capacity\_ICDH} = 42^{*31}$	$\mu M s^{-1}$	
	$K_M^{isocitrate} = 42^{29}$	μM	
	$K_{M\_3}^{NADP^+} = 4.4^{29}$	μM	
G3PDH			
$G3P + NADP^+ + H_2O \rightarrow 3PG + NADPH + 2H^+$	$V_{capacity\_G3PDH} = 25^{*13}$	$\mu M s^{-1}$	
	$K_M^{G3P} = 31^{23}$	μM	
	$K_{M\_4}^{NADP^+} = 17^{23}$	μM	

*measured in Arabidopsis leaves and calculated as in Supplementary Table S2.

Modelling glutathione homeostasis

Enhanced availability of intracellular H_2O_2 causes accumulation of glutathione, mainly as GSSG, with a substantial proportion of this GSSG being found in the vacuole (42). Key underlying processes are likely oxidant-stimulated activation of glutathione synthesis and tonoplast transport of GSSG. Hence, in addition to redox reactions involving GSH and GSSG, these processes were included in the model.

Glutathione neosynthesis

γ -Glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) catalyzes the first committed step in glutathione biosynthesis. The second enzyme is the glutathione synthetase (GSH-S). Like the enzymes discussed above, glutathione synthesis may not be located in a single compartment in planta, since Arabidopsis γ -ECS is in the chloroplast while GSH-S is probably mainly in the cytosol (64). However, knowledge of the physiological operation of the transport

processes that link the two enzymes is not sufficient to allow transport to be parametrized within the model. Consequently, as for the redox reactions, compartmentation was not considered.

Both enzymes have an irreversible random ter-reactant mechanism, which involves the formation of a peptide bond at the expense of ATP hydrolysis (24, 25). In terms of factors limiting GSH synthesis, most attention has focused on cysteine concentration, redox-dependent activation of γ -ECS, and feedback inhibition of the enzyme by GSH (37). The availability of ATP is expected to play a less important role in determining the rate of both reactions, and its cellular status is very complex to model. Therefore, it was not included in the model, and irreversible bi-reactant equations were used for both enzymes.

For γ -ECS, an irreversible Michaelis-Menten random bi-reactant mechanism with competitive inhibition by GSH against glutamate was considered. Then, to model redox control of γ -ECS, we modelled a function that activates the enzyme as cellular glutathione redox potential increases (becomes more positive, or more oxidizing). Under oxidizing conditions, the demand for glutathione increases and γ -ECS is activated. Therefore, if the cellular environment shifts to a more reduced potential, γ -ECS activity decreases. Thus, the equation for γ -ECS activity, including feedback inhibition by GSH and regulation by the glutathione redox potential ($F_{act\_redox\_pot}$), becomes:

$$(Eq. 15) \quad V_{\gamma-ECS} = V_{capacity\_ \gamma-ECS} \frac{[Glu][Cys]}{K_M^{Glu} K_M^{Cys} + K_M^{Cys} [Glu] + K_M^{Glu} [Cys] \left(1 + \frac{[GSH]}{K_i}\right) + K_M^{Glu} K_M^{Cys} \frac{[GSH]}{K_i} + [Glu][Cys]} F_{act\_redox\_pot}$$

Glutathione redox potential is calculated assuming a midpoint potential of -240 mV and calculated according to the Nernst equation:

$$(Eq. 16) \quad P_{redox\_pot} = -240 - 29.6 \log_{10} \left(\frac{[GSH][GSH]}{GSSG} \right)$$

Although the factors that achieve thiol-disulfide regulation of γ -ECS are not clearly established, we introduced the term $F_{act\_redox\_pot}$ to link the activation state of the enzyme to the redox potential of glutathione, in which the midpoint activation redox potential (50% of the enzyme activated) was taken to be -220 mV. This value was found to give realistic results following several test runs.

$$(Eq. 17) \quad F_{act\_redox\_pot} = \frac{1}{1 + \exp[-0.05(P_{redox\_pot} + 220)]}$$

For GSH-S the rate equation used was an adapted irreversible Michaelis-Menten random bi-reactant mechanism from Jez and Cahoon (24).

$$(Eq. 18) \quad V_{GSH-S} = V_{capacity\_GSH-S} \frac{[\gamma EC][Gly]}{K_M^{\gamma EC} K_M^{Gly} + K_M^{Gly} [\gamma EC] + K_M^{\gamma EC} [Gly] + [\gamma EC][Gly]}$$

The glutamate, cysteine, and glycine concentrations were set at 21 mM, 0.3 mM, and 1.8 mM (28, 46, 68).

Vacuolar sequestration of GSSG

Previous studies indicated that stimulated activity of the ascorbate-glutathione pathway leads to GSSG accumulation in the vacuole (42). We modelled a function of GSSG transport from the cytosol to the vacuole. According to Lu et al. (30), the uptake of GSSG in yeast conformed to Michaelis–Menten kinetics. Thus, an irreversible Michaelis–Menten rate equation was used as follows:

$$(Eq. 19) \quad J_{GSSG} = V_{capacity\_ABCC} \frac{[GSSG]_{out\_of\_vacuole}}{K_M^{ABCC\_GSSG} + [GSSG]_{out\_of\_vacuole}}$$

SUPPLEMENTARY TABLE S5. KINETIC PARAMETERS USED TO MODEL GLUTATHIONE HOMEOSTASIS			
Enzyme / transporter			
Reaction	Kinetic parameters	Unit	
γ -ECS			
Usually ter-reactant but modelled as bi-reactant*			
$Glu + Cys \rightarrow \gamma EC$	$V_{capacity\_ \gamma ECS} =$	0.042* ⁴³	$\mu M\ s^{-1}$
	$K_M^{Glu} =$	9100 ²⁵	μM
	$K_M^{Cys} =$	1600 ²⁵	μM
	$K_i^{GSH} =$	420 ²⁰	μM
GSH-S			
Usually ter-reactant but modelled as bi-reactant*			
$\gamma EC + Gly \rightarrow GSH$	$V_{capacity\_ GSH-S} =$	0.83* ⁴³	$\mu M\ s^{-1}$
	$K_M^{\gamma EC} =$	39 ²⁴	μM
	$K_M^{Gly} =$	1510 ²⁴	μM
ABCC transporter			
$GSSG_{out\_of\_vacuole} \rightarrow GSSG_{in\_the\_vacuole}$	$V_{capacity\_ ABCC} =$	0.028	$\mu M\ s^{-1}$
	$K_M^{GSSG_{out\_of\_vacuole}} =$	400 ⁵⁴	μM

* measured in Arabidopsis leaves and calculated according to the same way as indicated in Supplementary Table S2.

Initial values and ordinary differential equations (ODEs)

Unless stated otherwise in the text, the metabolite concentrations obtained after stabilization of the model in the dark are listed in Supplementary Table S6. These correspond to values outside the vacuole.

SUPPLEMENTARY TABLE S6. INITIAL VALUES USED TO RUN THE MODEL (μM)		
Substrate	Value	Description
$[H_2O_2]$	1.0	Concentration of H_2O_2
$[ASC]$	20 000	Concentration of ASC
$[MDHA]$	0.07	Concentration of MDHA
$[DHA]$	0.0000075	Concentration of DHA
$[GSH]$	2 016	Concentration of GSH
$[GSSG]$	1.72	Concentration of GSSG
$[NADPH]$	48.9	Concentration of NADPH
$[NADP^+]$	1.1	Concentration of $NADP^+$
$[\gamma - EC]$	0.09	Concentration of γ -EC

The complete list of ordinary differential equations (ODEs) that determine the concentrations of metabolites in the model is the following:

$$(Eq. 20) \quad \frac{dS_{H_2O_2}}{dt} = (V_{H_2O_2} - V_{APX} - 2V_{cat})$$

$$(Eq. 21) \quad \frac{dS_{\gamma EC}}{dt} = (V_{\gamma ECS} - V_{GSH-S})$$

$$(Eq. 22) \quad \frac{dS_{ASC}}{dt} = (-2V_{APX} + V_{GSH\_DHA} + V_{DHAR} + V_{MDHA\_dismutation} + 2V_{MDHAR})$$

$$(Eq. 23) \quad \frac{dS_{MDHA}}{dt} = (2V_{APX} - 2V_{MDHA\_dismutation} - 2V_{MDHAR})$$

$$(Eq. 24) \quad \frac{dS_{DHA}}{dt} = (V_{MDHA\_dismutation} - V_{GSH\_DHA} - V_{DHAR})$$

$$(Eq. 25) \quad \frac{dS_{GSH}}{dt} = (2V_{GR} + V_{GSH-S} - 2V_{GSH\_DHA} - 2V_{DHAR})$$

$$(Eq. 26) \quad \frac{dS_{GSSG}}{dt} = (V_{GSH\_DHA} + V_{DHAR} - V_{GR} - J_{GSSG})$$

$$(Eq. 27) \quad \frac{dS_{NADPH}}{dt} = (2V_{OPPP} + V_{ICDH} + V_{G3PDH} + V_{eJ} - V_{MDHAR} - V_{GR})$$

$$(Eq. 28) \quad \frac{dS_{NADP^+}}{dt} = (V_{MDHAR} + V_{GR} - 2V_{OPPP} - V_{ICDH} - V_{G3PDH} - V_{eJ})$$

Supplemental File 2. Experimental methods

(1) Numerical techniques

The model was coded using Fortran 90 and equations were solved numerically using the Powell hybrid method (40) in the NAG Fortran library routine (C05NBF).

(2) Plant Growth and Sampling

First, seeds were sown in soil and kept at 4°C in dark during 2 days. They were then transferred to a controlled-environment growth chamber at a specified photoperiod 16 h day/8h night. Plants were grown under an irradiance of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at leaf level, high CO₂ (3000 ppm) to block photorespiration, 20°C (day) /18°C (night), 65% humidity, and given nutrient solution twice per week. More than two weeks later, plants were transferred to air (400 ppm CO₂) under the same photoperiod, irradiance, temperature, humidity and the same watering conditions. At the indicated times (Fig. 5), samples were taken and rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Data are means $\pm$ SE of at least three independent samples from different plants.

(3) Enzyme assays and metabolite analysis

Extractable enzyme activities to determine capacities were measured according to protocols detailed in Noctor et al. (36). Briefly, catalase was measured by the removal of H₂O₂ monitored at 240 nm, APX as H₂O₂-dependent ascorbate oxidation at 290 nm, MDHAR as MDHA-dependent NADPH oxidation at 340 nm, DHAR as GSH-dependent formation of ascorbate from DHA at 265 nm, and GR as GSSG-dependent NADPH oxidation at 340 nm. Oxidized and reduced forms of glutathione and ascorbate were measured by plate-reader assay as described by Queval and Noctor (41).

Supplemental File 3. Supplemental references

1. Arabaci G. Partial purification and some properties of catalase from dill (*Anethum graveolens* L.). *J Bio Life Sci* 2: 11–15, 2011.
2. Asada K and Takahashi M. Production and scavenging of active oxygen species in photosynthesis. In D Kyle, C Osmond, C Arntzen, eds, *Photoinhibition. Elsevier Science Publishers, New York*, pp 227–287, 1987.
3. Baldocchi DD. An analytical solution for coupled leaf photosynthesis and stomatal conductance models. *Tree Physiol* 14: 1069–1079, 1994.
4. Ball JT, Woodrow IE, and Berry JA. A model predicting stomatal conductance and its contribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. *Progress in Photosynthesis Research* (ed. I. Biggins), pp. 221–224. Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands, 1987.
5. Bielski BHJ, Comstock DA, and Bowen RA. Ascorbic acid free radicals. I. Pulse radiolysis study of optical absorption and kinetic properties. *J Am Chem Soc* 93: 5624–5629, 1971.
6. Bisswanger H. Enzymkinetik: Theorie und Methoden. *VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany*, p 140, 1994.
7. Borraccino G, Dipierro S, and Arrigoni O. Purification and properties of ascorbate free radical reductase from potato tubers. *Planta* 167: 521–526, 1986.
8. Cardi M, Zaffagnini M, De Lillo A, Castiglia D, Chibani K, Gualberto JM, Rouhier N, Jacquot J-P, and Esposito S. Plastidic P2 glucose-6P dehydrogenase from poplar is modulated by thioredoxin m-type: distinct roles of cysteine residues in redox regulation and NADPH inhibition. *Plant Sci* 252: 257–266, 2016.
9. Castiglia D, Cardi M, Landi S, Cafasso D, and Esposito S. Expression and characterization of a cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase isoform from barley (*Hordeum vulgare*) roots Protein. *Expr Purif* 112: 8–14, 2015.
10. Chen RD and Gadal P. Structure, functions and regulation of NAD and NADP dependent isocitrate dehydrogenases in higher plants and in other organisms. *Plant Physiol Biochem* 28: 411–427, 1990.
11. De Pury DGG and Farquhar GD. Simple scaling of photosynthesis from leaves to canopies without the errors of bigleaf models. *Plant Cell and Environ* 20: 537–557, 1997.
12. del Río LA, Ortega MG, López AL, and Gorgé JL. A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. Application to the kinetic study of the pea leaf enzyme. *Anal Biochem* 80: 409–415, 1977.
13. Dghim AA, Mhamdi A, Vaultier MN, Hasenfratz-Sauder MP, LE Thiec D, Dizengremel P, Noctor G, and Jolivet Y. Analysis of cytosolic isocitrate dehydrogenase and glutathione reductase 1 in photoperiod-influenced responses to ozone using Arabidopsis knockout mutants. *Plant Cell Environ* 36: 1981–1991, 2013.
14. Farquhar GD and von Caemmerer S. Modeling of photosynthetic responses to environmental conditions. In: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 549–587, 1982.

15. Farquhar GD, von Caemmerer S, and Berry JA. A biochemical model of photosynthetic carbon dioxide assimilation in leaves of 3-carbon pathway species. *Planta* 149: 78–90, 1980.
16. Gerhardt R, Stitt M, and Heldt HW. Subcellular metabolite levels in spinach leaves. Regulation of sucrose synthesis during diurnal alterations in photosynthetic partitioning. *Plant Physiol* 83: 399–407, 1987.
17. Halliwell B and Foyer CH. Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves. *Planta* 139: 9–17, 1978.
18. Hausladen A and Kunert KJ. Effects of artificially enhanced levels of ascorbate and glutathione on the enzymes monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase, and glutathione reductase in spinach (*Spinacia oleracea*). *Physiol Plant* 79: 384–388, 1990.
19. Heinze M and Gerhardt B. Plant catalase. In *Plant Peroxisomes: Biochemistry, Cell Biology and Biology and Biotechnological Application* (eds A.Baker and I.A.Graham), pp 103–140, 2002.
20. Hell R and Bergmann L. γ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* 180: 603–612, 1990.
21. Hossain MA and Asada K. Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J Biol Chem* 260: 12920–12926, 1985.
22. Hossain MA and Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol* 25: 85–92, 1984.
23. Iglesias AA and Losada M. Purification and kinetic and structural properties of spinach leaf NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 260: 830–840, 1988.
24. Jez JM and Cahoon RE. Kinetic mechanism of glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279: 42726–42731, 2004.
25. Jez JM, Cahoon RE, and Chen S. *Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase: Functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. *J Biol Chem* 279: 33463–33470, 2004.
26. Kato N, Sahm H, Schütte H, and Wagner F. Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phospho- gluconate dehydrogenase from a methanol-utilizing yeast *Candida boidinii*. *Biochim Biophys Acta* 566: 1–11, 1979.
27. Kelly GJ and Gibbs M. Non-reversible d-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of plant tissues. *Plant Physiol* 52: 111–118, 1973.
28. Krueger S, Niehl A, Martin M, Steinhauser D, Donath A, Hildebrandt T, Romero L, Hoefgen R, Gotor C, and Hesse H. Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 32: 349–367, 2009.
29. Leterrier M, Barroso JB, Palma JM, and Corpas FJ. Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase in *Arabidopsis* leaves and roots. *Biol Plant* 56: 705–710, 2012.
30. Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hortensteiner S, Martinoia E, and Rea PA. AtMRP2, and *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant cell* 10: 267–282, 1998.

31. Mhamdi A and Noctor G. Analysis of the roles of the Arabidopsis peroxisomal isocitrate dehydrogenase in leaf metabolism and oxidative stress. *Environ Exp Bot* 114: 22–29, 2015.
32. Mhamdi A, Hager J, Chaouch S, Queval G, Han Y, Taconnat L, Saindrenan P, Gouia H, Issakidis-Bourguet E, Renou JP, and Noctor G. Arabidopsis GLUTATHIONE REDUCTASE 1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular H₂O₂ and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol* 153: 1144–1160, 2010.
33. Mhamdi A, Mauve C, Gouia H, Saindrenan P, Hodges M, and Noctor G. Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in Arabidopsis leaves. *Plant Cell Environ* 33: 1112–1123, 2010.
34. Mirfakhrai M and Auleb L. Partial purification and kinetic characterization of wheat germ glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Pl Physiol* 135: 191–196, 1989.
35. Mittler R, and Zilinskas B. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *FEBS Lett* 289: 257–259, 1991.
36. Noctor G, Mhamdi A, and Foyer CH. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant Cell Environ* 39: 1140–1160, 2016.
37. Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, and Foyer CH. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ* 35: 454–484, 2012.
38. Palomo J, Gallardo F, Suarez M F, and Canovas FM. Purification and Characterization of NADP1-Linked Isocitrate Dehydrogenase from Scots Pine. *Plant Physiol* 118: 617–626, 1998.
39. Polle A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol* 126: 445–462, 2001.
40. Powell MJD. A hybrid method for nonlinear algebraic equations. In *Numerical Methods for Nonlinear Algebraic Equations*, Gordon and Breach, London (ed Rabinowitz P), 7: 87–114, 1970.
41. Queval G and Noctor G. A plate-reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Anal Biochem* 363: 58–69, 2007.
42. Queval G, Jaillard D, Zechmann B, and Noctor G. Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ* 34: 21–32, 2011.
43. Queval G, Thominet D, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Gakière B, and Noctor G. H₂O₂-activated up-regulation of glutathione in Arabidopsis involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Molecular Plant* 2: 344–356, 2009.
44. Rahantaniaina MS, Li S, Chatel-Innocenti G, Tuzet A, ElIssakidis-Bourguet E, Mhamdi A, and Noctor G. Cytosolic and chloroplastic DHARs cooperate in oxidative stress-driven activation of the salicylic acid pathway. *Plant Physiol* 174: 956–971, 2017.
45. Rahantaniaina MS, Tuzet A, Mhamdi A, and Noctor G. Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants? *Front Plant Sci* 4:477, 2013.

46. Riens B, Lohaus G, Heineke D, and Heldt HW. Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol* 97: 227–233, 1991.
47. Rius SP, Casati P, Iglesias AA, and Gomez-Casati DF. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant lacking a cytosolic non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Mol Biol* 61: 945–957, 2006.
48. Scandalios JG. Regulation and properties of plant catalases. In *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants* (eds Foyer CH and Mullineaux PM), 275–315, 1994.
49. Schnarrenberger C, Oeser A, and Tolbert NE. Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Arch Biochem Biophys* 154: 438–448, 1973.
50. Segel IH. Steady-state kinetics of multi reactant enzymes. In *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons, New York, 684–687, 1975.
51. Sharkey TD, Bernacch CJ, Farquhar GD, and Singsaas EL. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant Cell Environ* 30: 1035–1040, 2007.
52. Shimaoka T, Miyake C, and Yokota A. Mechanism of the reaction catalyzed by dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts. *Eur J Biochem* 270: 921–928, 2003.
53. Tanaka Y, Sugano SS, Shimada T, Hara-Nishimura I. Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in *Arabidopsis*. *New Phytol* 198: 757–764, 2013.
54. Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hörtensteiner S, Matile P, Amrhein N, and Martinoia E. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J* 13: 773–780, 1998.
55. Tuzet A, Granier A, Betsch P, Peiffer M, and Perrier A. Modelling hydraulic functioning of an adult beech stand under non-limiting soil water and severe drought condition. *Ecol Model* 348: 56–77, 2017.
56. Tuzet A, Perrier A, and Leuning R. A coupled model of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration. *Plant Cell Environ* 26: 1097–1116, 2003.
57. Valero E, González-Sánchez MI, Macià H, and García-Carmona F. Computer simulation of the dynamic behavior of the glutathione-ascorbate redox cycle in chloroplasts. *Plant Physiol* 149: 1958–1969, 2009.
58. Valero E, Macià H, Fuente I, Hernandez JA, Gonzales-Sanchez MI, and Garcia-Carmona F. Modeling the ascorbate-glutathione cycle in chloroplasts under light/dark conditions. *BMC Systems Biol* 10: 11, 2016.
59. Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, van de Cotte B, Morsa S, Ravanat JL, Hegie A, Triantaphylidès C, Shulaev V, Van Montagu MC, Van Breusegem F, and Mittler R. Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1711–1716, 2011.
60. Vanoni MA, Wong KK, Ballou DP, and Blanchard JS. Glutathione reductase: comparison of steady-state and rapid reaction primary kinetic isotope effects exhibited by the yeast, spinach, and *Escherichia coli* enzymes. *Biochemistry* 29: 5790–5796, 1990.
61. Vaseghi S, Baumeister A, Rizzi M, and Reuss M. In vivo dynamics of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 1: 128–140, 1999.

62. Veljovic-Jovanovic SD, Pignocchi C, Noctor G, and Foyer CH. Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of Arabidopsis is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol* 127: 426–435, 2001.
63. von Caemmerer. Biochemical Models of Leaf Photosynthesis, Vol 2. *CSIRO Publishing*, Collingwood, Australia, 2000.
64. Wachter A, Wolf S, Steininger H, Bogs J, and Rausch T. Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: Implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J* 41: 15–30, 2005.
65. Wakao S and Benning C. Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in Arabidopsis. *Plant J* 41: 243–256, 2005.
66. Weise S, Carr D, Bourke A, Hanson DT, Swarthout D, and Sharkey T. The arc mutants of Arabidopsis with fewer large chloroplasts have a lower mesophyll conductance. *Photosynth Res* 124: 117, 2015.
67. Welinder KG. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 388–393, 1992.
68. Winter H, Robinson DG, and Heldt HW. Subcellular Volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta* 193: 530–535, 1994.
69. Zera AJ, Newman S, Berkheim D, Black C, Klug L, and Crone E. Purification and characterization of cytoplasmic NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, and amplification of the NADP⁺-IDH gene from the wing-dimorphic sand field cricket, *Gryllus firmus*. *J Insect Sci* 11: 53, 2011.

Partie III. Discussions et conclusions générales

Compte tenu des contextes socio-économique, politique et environnemental actuels (vus dans la **Partie I**), il est devenu urgent d'apporter des réponses, basées sur des connaissances scientifiques face à l'impact grandissant des contraintes environnementales sur les plantes et leurs conséquences sur les sociétés humaines. S'inscrivant pleinement dans cette dynamique, les résultats majeurs produits au cours de ce travail de thèse ont été intégrés dans la base de données « *The Arabidopsis Information Resource* » (<http://www.arabidopsis.thaliana.org/>).

III.1. Le cytosol, un site clé dans la cellule végétale pour la gestion du stress oxydant chez la plante face aux contraintes environnementales

Comme développé dans l'introduction générale (**Partie I**), la majorité des contraintes abiotiques et biotiques mènent à une situation connue sous le terme de « stress oxydant ». Vue sa stabilité relative et sa capacité à traverser les membranes, cette étude a été focalisée sur le H_2O_2 qui est l'une des espèces réactives de l'oxygène capables de traduire le signal oxydant dans la cellule. Son importance dans la modulation du statut du glutathion, le thiol-disulfure prépondérant de la cellule, a été particulièrement analysée. Alors que des études avaient montré l'importance du glutathion en tant qu'antioxydant et molécule signal, le rôle des différentes enzymes liant la détoxification du H_2O_2 au glutathion restaient à élucider.

Les résultats vus dans la **Sous-partie II.1** ont mis en évidence que parmi les voies du métabolisme du H_2O_2 glutathion-dépendantes, les isoformes cytosoliques des enzymes seraient les meilleures candidates pour jouer un rôle critique dans beaucoup de conditions de stress (**Articles 1**). En effet, la compilation des données : (1) biochimique, (2) transcriptomique et (3) génétique disponibles dans la littérature ont conduit à cette conclusion. Ensuite, des précisions complémentaires ont été apportées grâce, aux études génétiques menées pendant cette thèse (**Partie II, Sous-parties II.2 et II.3**). Dans la famille des DHARs (les enzymes candidates annoncées dans l'**Article 1**), nous avons montré que les isoformes cytosoliques DHAR1 et DHAR2 sont les plus sollicitées dans le couplage du métabolisme du H_2O_2 au glutathion (**Articles 2 et 3**). Notre étude permet ainsi de confirmer que le cytosol est un compartiment très actif en situation de stress. Ceci est en accord avec d'autres études sur des mutants affectés au niveau de l'APX1 ou la GR1 cytosolique (Davletova et al., 2005 ; Mhamdi et al., 2010b; Vanderauwera et al., 2011). Par ailleurs, des études ont montré via l'utilisation de la sonde roGFP (pour « redox sensitive Green Fluorescent Protein »), qui détecterait le potentiel redox du glutathion, que des stress comme la sécheresse ou encore la blessure conduisent à une sur-oxydation du cytosol (Meyer et al., 2007, Jubany-Mari et al., 2010).

En outre, le cytosol peut être considéré comme un site clé de l'intégration du signal redox. En effet, il est largement admis que les changements au niveau du potentiel redox impactent sur les protéines thiol-dépendantes qui sont redox-sensibles et probablement impliquées dans les cascades de signalisation ROS (Lemaire et al., 2007 ; Noctor et al., 2012 ; Dietz et Hell, 2015). Ces changements redox liés aux thiols déterminent, par exemple, la signalisation liée à la pathogenèse (Tada et al., 2008). Ces réactions redox cytosoliques peuvent également contrôler la synthèse des protéines par modifications post-traductionnelles de l'appareil de la traduction (Moore et al., 2016). En effet, indépendamment des effets sur les taux de transcription, la signalisation

oxydative peut être médiée par la régulation de la traduction et donc modifier la synthèse protéique (Branco-Price et al., 2008).

III.2. Importance des DHAR dans la modulation du statut du glutathion, élément clé dans le déclenchement des signaux en aval

Dans la plupart des compartiments subcellulaires, notamment dans le cytosol, le glutathion se trouve en grande proportion sous sa forme réduite (GSH). Cependant, en réponse aux stress biotiques et abiotiques, le glutathion s'accumule, et s'oxyde, probablement car il sert en tant que réducteur dans les réactions antioxydantes (Edwards et al., 1991 ; Sen Gupta et al., 1991 ; May et al., 1996 ; Vanacker et al., 2000 ; Bick et al., 2001 ; Gomez et al., 2004 ; Koornneef et al., 2008 ; Han et al., 2013a). Dans le mutant conditionnel *cat2*, outil de prédilection utilisé pendant ma thèse pour moduler la disponibilité du H₂O₂ photorespiratoire, le glutathion est environ 2-3 fois plus élevé que dans le sauvage Col-0, et s'accumule essentiellement sous sa forme oxydée, le GSSG (Queval et al., 2007). Les études préalables ont montré qu'un traitement exogène avec du GSSG a des effets positifs sur l'expression des gènes liés au SA et JA (Han et al., 2013a ; 2013b). Le GSSG pourrait donc agir comme une molécule signal pour activer des réponses phytohormonales en aval (Han et al., 2013a ; 2013b). Et pourtant jusqu'ici, aucune étude, ne s'était penchée sur la question de l'oxydation du glutathion et donc de la production du GSSG (**Article 1**).

Les données de la littérature suggéraient que plusieurs types d'enzyme pourraient catalyser la production de GSSG dans la cellule végétale : les DHAR, les GSNOR, les GPX, les GST ou encore les PRXII-GRX (**Article 1**, Fig. 1). Certaines de ces enzymes génératrices de GSSG ont une activité peroxydase utilisant, directement ou indirectement, le glutathion comme réducteur. Certaines ont leurs niveau de transcrits élevé en condition de stress (**Article 1**, Fig. 4). Cependant, les études génétiques permettant de préciser leur fonction par rapport au GSSG étaient quasi inexistantes. Dans les S-parties II.2 et II.3, j'ai analysé certaines des enzymes candidates identifiées. Des preuves génétiques ont bien été apportées (**Articles 2 et 3**) pour montrer que ce n'est pas directement via des peroxydases GSH-dépendantes que le glutathion s'oxyde, mais plutôt, et essentiellement, via la voie ascorbate-glutathion. Précisément, ce sont les DHARs qui oxydent le glutathion, en régénérant l'ascorbate qui est utilisé comme réducteur par l'APX. L'absence des DHARs, en particulier les isoformes cytosoliques, dans le fond génétique *cat2* diminue l'oxydation du glutathion et la mort cellulaire, ainsi que les réponses de défense, induites par la déficience en catalase (**Articles 2 et 3**). Ces résultats ont validé l'importance du rôle joué par les DHARs dans la régulation du statut du glutathion, dans la transmission du signal ROS et l'interconnexion avec d'autres voies de signalisation.

En particulier, des études poussées sur les mutants *dhar* dépourvus particulièrement des isoformes cytosoliques démontrent que le statut du glutathion est étroitement lié à la voie de signalisation du SA dans le fond *cat2* (**Articles 2 et 3**). La quantification des lésions et la coloration au bleu de trypan ont mis en évidence une différence phénotypique nette apparente entre *cat2* et les deux mutants *cat2 dhar1 dhar2* et le quadruple mutant (**Article 2**, Fig. 9.A). Pour explorer les processus sous-jacents à ces effets phénotypiques, des analyses des transcrits d'un gène clé impliqué dans la synthèse de l'acide salicylique (*ICS1*) et de deux gènes liés aux réponses

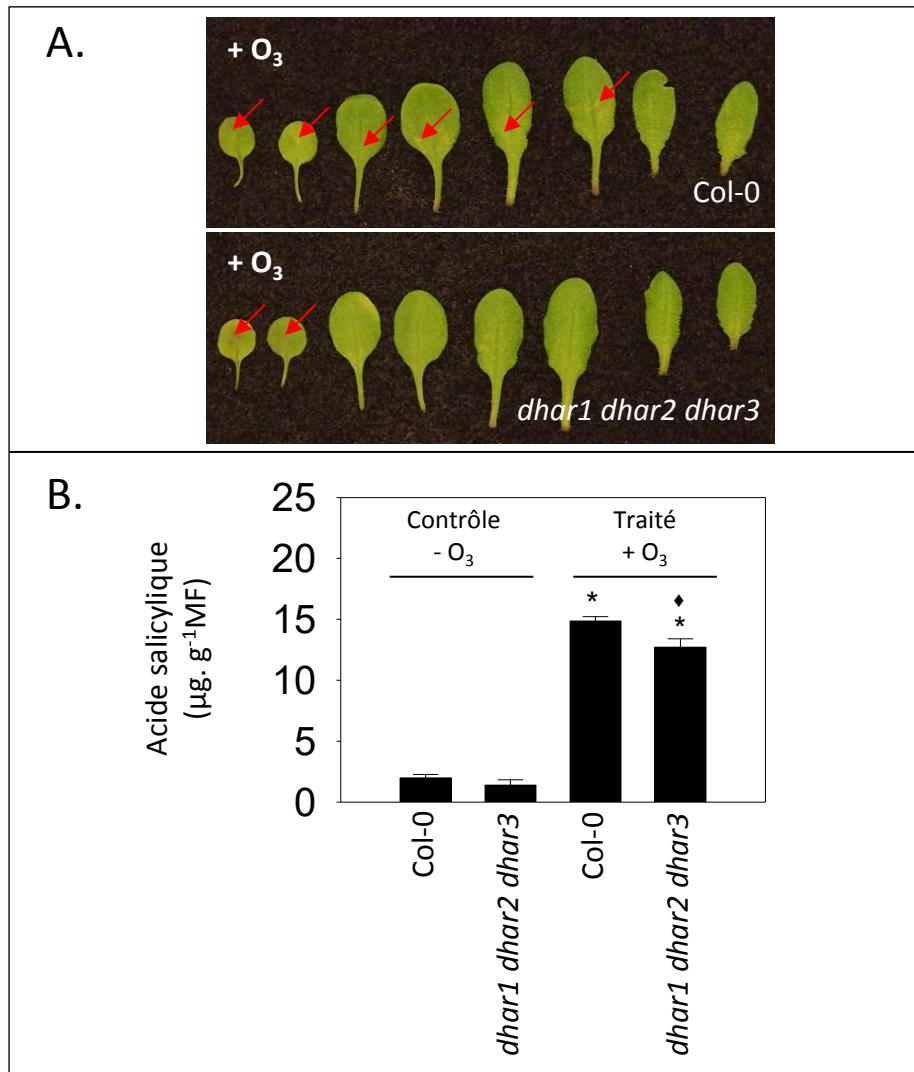


Figure 18 : Impact d'une fumigation à l'ozone sur le phénotype et la teneur en acide salicylique chez le triple mutant *dhar1 dhar2 dhar3* comparé à Col-0

Les plantes ont été cultivées en chambre de culture à Nancy sous une photopériode de 16 heures avec un éclairage de $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Au bout de trois semaines, elles ont été transférées et réparties dans des chambres de fumigation. Chaque plante a été maintenue en chambre de fumigation dans des conditions environnementales identiques à celles régnant dans les chambres de culture. A l'issue de cette période dite d'acclimatation, la moitié des plantes, a été traitée à une concentration en ozone de $350 \text{ ppb} \pm 10 \text{ ppb}$ pendant 7 h (de 10 h à 17 h) pendant deux jours. L'autre moitié non traitée constitue le groupe contrôle. Après le traitement à l'ozone, les plantes ont été soumises à 24 h de période de récupération. A. Environ une quinzaine de plantes représentatives ont été ensuite photographiées, les flèches rouges indiquent quelques points de lésions visibles après le traitement à l'O₃. B. Le dosage de SA a été effectué sur une moyenne $\pm$ SE de quatre réplicats biologiques. * indique une différence significative dans la teneur en SA entre le groupe traité et le groupe non traité à l'ozone avec une valeur- $p < 0,05$ tandis que ♦ indique une différence significative entre Col-0 et le triple mutant *dhar1 dhar2 dhar3* toujours à la même valeur- $p < 0,05$.

à la pathogénèse SA-dépendantes (*PR1* et *PR2*) ont été réalisées. Ces trois gènes, fortement induits dans le contexte *cat2*, le sont toujours, par rapport au sauvage, mais de manière moins marquée dans le quadruple mutant *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* (**Article 2**, Fig. 8). L'analyse du contenu en SA a révélé que tous les génotypes porteurs de la mutation *cat2* accumulaient du SA à l'exception des mutants cumulant *cat2* et les mutations de deux ou trois gènes de DHAR chez lesquels les niveaux de SA sont proches de celui de Col-0, le sauvage (**Article 2**, Fig. 9.C). Ces résultats confirment que la modulation du statut du glutathion via les DHARs, déclenche bien des signaux en aval, dans la voie de signalisation du SA.

Des tests de résistance aux pathogènes ainsi que d'acclimatation à l'ozone avaient déjà montré l'importance de ces types de signaux dans les réponses à ces stress. Dans notre étude, des analyses de la résistance aux bactéries virulentes ont été effectuées, elles ont mis en évidence une perte de la résistance induite par *cat2* chez le mutant dépourvu des trois isoformes de la DHAR (**Article 2**, Fig. S8.A). Nous avons également observé que le SA s'accumulait moins dans cette lignée (**Article 2**, Fig. S8.B). Pour l'exposition à l'ozone, nos résultats préliminaires, qui nécessitent confirmation, suggèrent que le triple mutant *dhar1 dhar2 dhar3* serait moins sensible à ce polluant (Fig. 18). Il faudra renouveler cette expérience et mener une quantification précise des surfaces de lésion foliaire. En accord avec ce résultat préliminaire, le dosage du SA dans les plantes exposées à un stress ozone suggère la possibilité d'une diminution de l'accumulation du SA en conséquence de la perte des fonctions DHAR (Fig. 18). Ce résultat devra également être confirmé.

Le GSSG peut également jouer un rôle dans l'activation de la voie JA. Nous avons donc analysé l'expression de trois gènes marqueurs de cette voie dans Col-0, *cat2* et *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*. Deux des gènes codent pour des enzymes impliquées dans la synthèse (la lipoxygénase3, LOX3 et la 12-oxophytodienoate réductase 3, OPR3) le troisième codant pour une protéine impliquée dans la signalisation du JA (la jasmonate ZIM-domaine 10, JAZ10). En cohérence avec des études récentes (Han et al., 2013b), mes résultats renforcent l'idée que les expressions géniques associées au JA sont étroitement corrélées avec la teneur et le statut du glutathion (Fig. 19). Dans l'article Han et al. (2013b), il a été montré que le blocage de la synthèse du glutathion dans le mutant *cad2* empêche l'induction des gènes associés au JA observée chez *cat2*, notre analyse montre que cet effet coïncide avec le blocage de l'oxydation du glutathion via les DHARs (Fig. 19.A). De plus, la teneur en glutathion total chez le quadruple mutant semble similaire à celle de Col-0 (Fig. 19.B).

En conclusion, toutes les observations issues de l'**Article 2** ainsi que les résultats supplémentaires non publiés (Figs. 18 et 19), indiquent que le statut du glutathion serait principalement modulé par les DHARs cytosoliques, et ferait le lien entre le stress oxydant intracellulaire et l'activation des voies de signalisation en aval liées au SA et au JA.

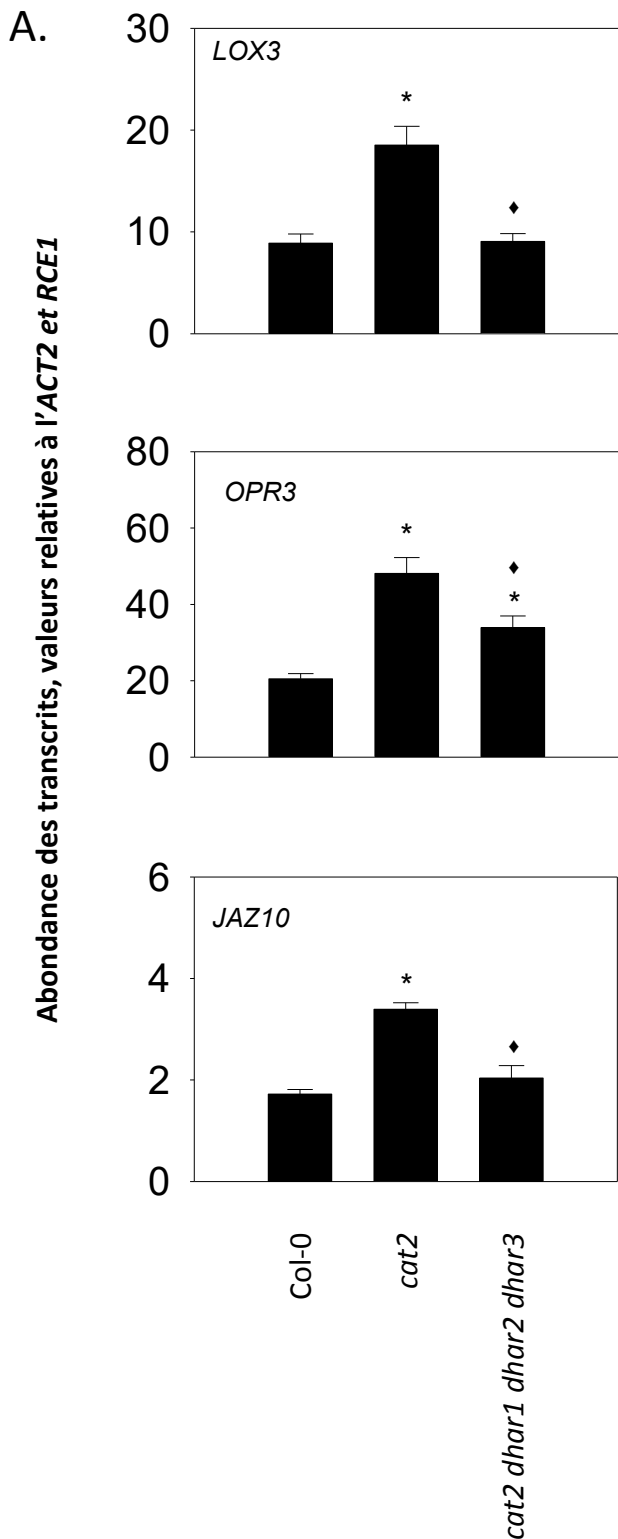
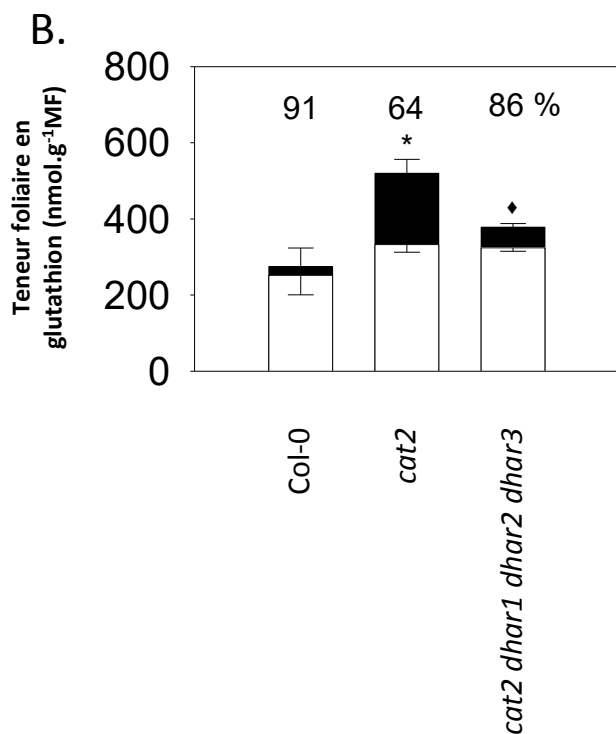


Figure 19 : Expression des gènes liés à l'acide jasmonique dans les lignées Col-0, *cat2* et *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*

A. Les transcrits de *LOX3*, *OPR3* et *JAZ10* ont été quantifiés par RT-PCRq dans des extraits de plantes âgées de trois semaines soumises à une photopériode de 16 h avec un éclairage de 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en utilisant deux gènes de référence (l'*ACTIN2* et le *RCE1*). Les données sont des moyennes $\pm$ SE de trois répétitions biologiques et ont été multipliées par 100 pour faciliter l'interprétation de leur expression. La différence significative entre les mutants et Col-0 avec une valeur-p $<0,05$ est indiquée par des astérisques tandis que les losanges indiquent une différence significative entre *cat2* et le quadruple mutant. B. Teneur foliaire en glutathion (ce graphique est issu de l'Article 2).



III.3. La MDHAR NADPH-dépendante, possible enzyme clé dans le couplage des principaux réducteurs ascorbate et glutathion dans la voie ascorbate-glutathion en situation de stress

Les **Sous-parties II.1, II.2 et II.3** des résultats établissent clairement la voie ascorbate-glutathion comme la principale voie métabolisant le H_2O_2 en utilisant du glutathion en situation de stress, par contre les déterminants du couplage entre l'ascorbate et le glutathion, les deux réducteurs importants impliqués dans cette voie, semble être moins clairs. Dans la voie ascorbate-glutathion, les DHARs utilisent le glutathion comme réducteur pour régénérer l'ascorbate. Ce serait donc des candidats privilégiés pour assurer ce couplage. Pourtant, comme le montrent les résultats de l'**Article 2**, si la teneur et le statut du glutathion sont bien impactés par l'absence des DHARs, aucun changement significatif n'a été observé ni dans la teneur, ni dans le statut redox de l'ascorbate chez le quadruple mutant *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*. Cependant, les analyses présentées dans la **Sous-partie II.4** ont bien montré que cet état peut être reproduit par l'approche de modélisation, et qu'il n'est pas nécessaire de considérer des voies d'oxydation du glutathion indépendantes de l'ascorbate pour simuler l'ensemble des données expérimentales.

Il est important de souligner que la concentration en ascorbate est variable en fonction des cellules, des organes et des plantes (Loewus et al., 1987 ; Córdoba-Pedregosa et al., 2003 ; Sanmartin et al., 2003 ; Zechmann et al., 2011). De ce fait, les résultats des études sur l'ascorbate peuvent varier avec le matériel utilisé. Si la régénération de l'ascorbate via les DHARs est bloquée, la teneur et le statut en ascorbate peuvent encore être influencés par différents processus. La concentration en ascorbate peut dépendre de la résultante entre sa synthèse et sa dégradation, indépendamment du glutathion. Il existe plusieurs voies pour synthétiser l'ascorbate. La voie GDP-Mannose/L-Galactose (Loewus et al., 1987 ; Smirnoff et Wheeler, 2000), considérée comme la principale. Il existe d'autres voies, dites alternatives, comme la voie du myo-inositol (Valluru et Van den Ende, 2011 ; Xiang et al., 2011) ou la voie du L-gulose (Wolucka et Montagu, 2003), ou encore une voie dont les précurseurs proviendraient de la dégradation des polysaccharides des parois cellulaires (Bulley, 2009). Néanmoins, des études ont montré, qu'en conditions de stress métabolique, par exemple un manque de sucres, une augmentation de l'activité de la voie myo-inositol-dépendante pourrait permettre le maintien du niveau d'ascorbate dans les cellules, malgré une diminution du stock de carbone (Li et al., 2010 ; Xiang et al., 2011).

Les mécanismes de dégradation de l'ascorbate chez les plantes, ne sont pas bien connus et semblent être irréversibles. Cependant, en l'absence des DHARs pour recycler le DHA, une probable hypothèse de sa dégradation n'est pas à exclure. En effet, le DHA peut être rapidement dégradé, de façon enzymatique ou non enzymatique, impactant négativement sur le pool total de l'ascorbate (Green et Fry, 2005). En plus de sa biosynthèse et sa dégradation, l'existence des transporteurs de l'ascorbate entre les différents compartiments subcellulaires favorise son déplacement lui permettant d'assurer diverses fonctions ascorbate-dépendantes. En effet, l'ascorbate est présent dans tous les compartiments de la cellule végétale (Zechmann et al., 2011) et sa forme oxydée DHA serait la forme préférentiellement transportée chez la plupart des plantes (Horemans et al., 1997). Plusieurs éléments de preuve suggèrent que le DHA peut traverser la membrane mitochondriale interne

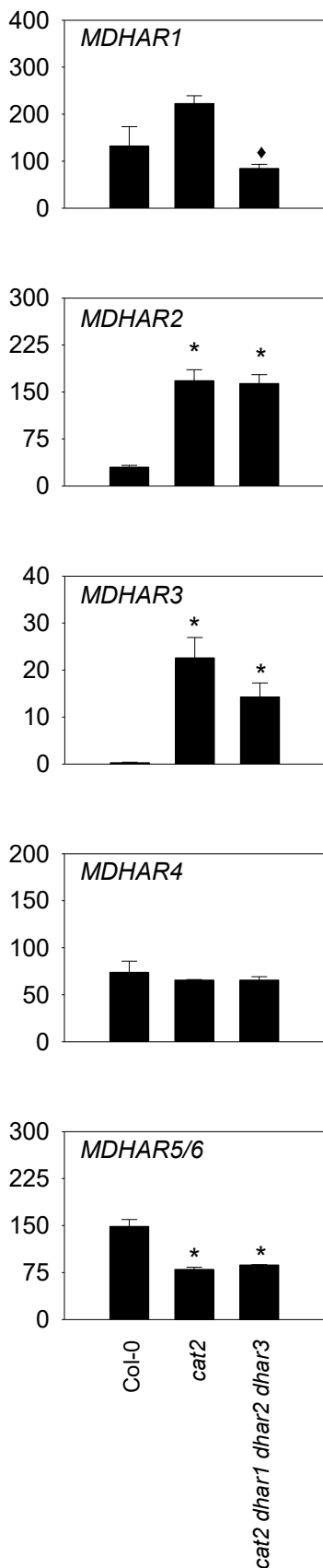


Figure 20 : Expression de tous les gènes codant pour la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) chez Col-0 et *cat2*

Les données sont exprimées par rapport à *ACT2* et *RCE1*, multipliées par 100 pour la facilité d'expression, et représente la moyenne de $\pm$ SE de trois réplicats biologiques de plantes poussant trois semaines sous 16h de lumière à un éclairage de $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

* indique une différence entre Col-0 et les mutants avec une valeur-p $< 0,05$ tandis que ♦ indique une différence significative entre *cat2* et le quadruple mutant *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* toujours à la même valeur-p $< 0,05$.

(Szarka et al., 2013). En outre, des transporteurs de phosphate de la famille PHT4 (AtPHT4;4) pourraient transporter l'ascorbate au niveau de la membrane interne du chloroplaste (Miyaji et al., 2015). Le DHA peut également être transporté à travers la membrane plasmique. Des études se sont intéressées à des protéines homologues des transporteurs sodium-dépendant (SVCTs) qui seraient capables d'assurer ce transfert (Maurino et al., 2006 ; Cai et al., 2014).

Bien qu'un possible équilibre entre la synthèse et la dégradation de l'ascorbate pourrait expliquer l'absence apparente d'impact de la perte des fonctions DHAR sur l'ascorbate, une autre hypothèse serait du côté du recyclage de l'ascorbate. En effet, d'autres enzymes que la DHAR peuvent régénérer l'ascorbate. De plus le recyclage est probablement une manière plus rapide et plus efficace. Le taux de recyclage de l'ascorbate chez les plantes supérieures serait estimé en moyenne à 13% par heure (Pallanca et Smirnoff, 2000). Parmi les enzymes régénératrices de l'ascorbate, il y a la MDHAR qui recycle directement le MDHA produit par l'APX (voir **Partie I**, Fig. 11). Une induction de la MDHAR prenant le relais du recyclage pourrait donc expliquer l'absence d'effet des mutations des DHARs sur le pool de l'ascorbate. Pour autant, nous n'avons mesuré aucune augmentation des gènes de MDHAR en conséquence des mutations des DHARs (**Article 3**, Fig. 3, voir également la Fig. 20 avec des données supplémentaires sur les autres isoformes de la MDHAR). Le dosage de l'activité des MDHARs ne montrant pas, non plus, de changement chez le quadruple mutant *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*, l'éventualité de régulations post-traductionnelles est à exclure (**Article 3**, Fig. 3). Une autre hypothèse testée lors de cette étude était l'induction de la GR qui pourrait expliquer l'état réduit du glutathion en l'absence de la DHAR. Ni une accumulation des transcrits GR (**Article 3**, Fig. S4), ni une augmentation significative de son activité (**Article 2**, Fig. 2) n'ont été trouvées. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence l'existence d'un mécanisme de compensation secondaire dans la voie ascorbate-glutathion chez les mutants *dhar*, suggérant que les modifications du statut du glutathion seraient à expliquer en termes d'un effet direct. La stabilité apparente du pool d'ascorbate pourrait être due à l'existence de plusieurs voies de régénération de cette molécule, dont une seule serait liée au glutathion.

L'approche de modélisation nous a permis d'apporter des éléments d'éclaircissement potentiel. En effet, notre approche théorique nous permet de décrire que la MDHAR, et non la DHAR, pourrait jouer le rôle clé dans le couplage entre l'ascorbate et le glutathion (**Article 4**). Le modèle a été développé pour servir d'outil de compréhension des mécanismes du stress oxydant chez la plante face aux contraintes environnementales. Si les résultats de simulation sont en bon accord avec les résultats expérimentaux, ils permettent de discuter les hypothèses scientifiques soulevées par les approches expérimentales. C'est de cette manière que nous avons conforté l'hypothèse d'un rôle régulateur clé joué par les MDHARs. Une simulation de la diminution de la capacité des MDHARs montre une amélioration de la dismutation du MDHA en DHA engageant, de ce fait, le glutathion chimiquement ou via l'intermédiaire de la DHAR (**Article 4**, Fig. 4). A l'inverse, une simulation de l'augmentation de la capacité MDHAR montre que l'enzyme peut agir comme un goulot d'étranglement favorisant la régénération de l'ascorbate à partir du MDHA au détriment de la dismutation de ce dernier en DHA. De ce fait, le glutathion est moins sollicité (**Article 4**, Fig. 4). D'avantage de simulations ont permis de mettre en évidence que la vitesse de la réaction catalysée par la MDHAR est fortement dépendante de la disponibilité en NADPH. Le pool de NADP(H) jouerait ainsi un rôle important dans la régénération des deux

réducteurs, l'ascorbate et le glutathion, en situation de stress (**Article 4**, Figs. 7 et 8). Des analyses expérimentales complémentaires seront nécessaires pour étayer cette hypothèse.

Partie IV. Perspectives

Tableau 5 : Induction des gènes ABCC chez *cat2*

Ce tableau provient de l'article de Noctor et al. (2013). Sont représentés en gras les gènes dont les valeurs d'expression moyennes sont significativement différentes entre *cat2* et Col-0 avec une valeur-p <0,05 (valeurs indiquées par des astérisques).

Gènes	Ratio <i>cat2</i> /Co-0
<i>ABCC1</i>	1.7*
<i>ABCC2</i>	2.3*
<i>ABCC3</i>	1.1
<i>ABCC4</i>	0.8
<i>ABCC5</i>	1.5*
<i>ABCC6</i>	1.9*
<i>ABCC7</i>	1.0
<i>ABCC8</i>	1.6*
<i>ABCC9</i>	0.9
<i>ABCC10</i>	1.7*
<i>ABCC11</i>	1.0
<i>ABCC12</i>	2.1*
<i>ABCC13</i>	2.3*
<i>ABCC14</i>	1.5*
<i>ABCC15</i>	0.9

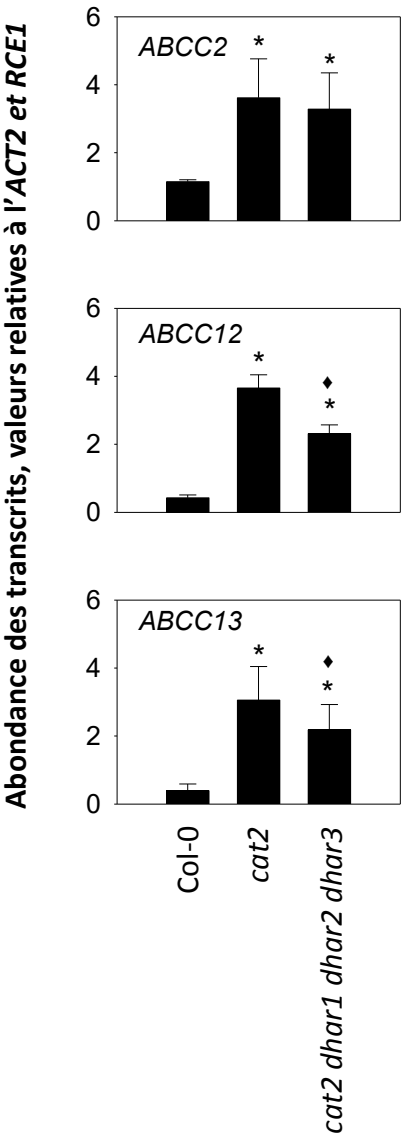


Figure 21 : Expression des gènes *ABCC*

Les transcrits *ABCC2*, *ABCC12* et *ABCC13* ont été quantifiés par RT-PCRq dans des plantes âgées de trois semaines en utilisant deux gènes de référence (ACTIN2 et RCE1). Les plantes ont été cultivées sous 16 h de photopériode avec 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les données sont des moyennes $\pm$ SE de trois réplicats biologiques et ont été multipliées par 100 pour faciliter l'expression. Les différences significatives entre Col-0 et *cat2* puis Col-0 et le quadruple mutant avec une valeur-p <0,05 sont indiquées par des *, tandis que le ♦ indique les différences significatives qu'il y a entre *cat2* et *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*.

Les progrès dans la compréhension du mécanisme complexe du stress oxydant chez la plante face aux contraintes environnementales ont été grandement accélérés par les travaux sur la plante modèle *Arabidopsis*. Nous y avons contribué grâce aux travaux développés dans le cadre de cette thèse. L'ensemble des connaissances maintenant disponibles suggère que les mécanismes redox cellulaires sont assez bien conservés entre les espèces végétales, ce qui permet d'envisager de les exploiter dans le but d'améliorer la performance des plantes cultivées. La conservation des mécanismes moléculaires et le succès que l'approche génétique a montré pour les décortiquer positionnent *Arabidopsis* comme un modèle adapté pour les études futures, tirant avantage des nombreux outils et informations déjà disponibles sur cette espèce modèle. Pour toutes ces raisons, la majeure partie des perspectives d'études après cette thèse, certaines étant déjà en cours de développement au laboratoire, sont basées sur l'utilisation des mutants *Arabidopsis*.

IV.1. Quels devenir pour le glutathion oxydé ?

Les études menées lors de cette thèse ont permis de déterminer les différentes voies antioxydantes qui entraînent l'oxydation du glutathion, mais le devenir du GSSG dans la cellule reste à élucider. En effet, nous avons vu que la production du GSSG joue un rôle important dans la signalisation redox, mais les questions sur l'importance de sa compartimentation, ainsi que de sa dégradation, dans la régulation de la signalisation en réponse aux stress restent à élucider.

IV.1.1. Séquestration vacuolaire

Au sein de l'équipe, les études antérieures sur le mutant *cat2* ont montré une forte accumulation du GSSG, particulièrement dans la vacuole (Queval et al., 2011). Même si cette accumulation a été également rapportée dans d'autres parties de la cellule (Queval et al., 2011 ; Han et al., 2013a), nous considérons que la vacuole serait un compartiment clé pendant le stress oxydant (Noctor et al., 2013). La séquestration vacuolaire du GSSG pourrait être nécessaire pour éliminer le signal actif dans le cytosol sous les conditions basales, afin d'éviter une stimulation oxydative excessive sous les conditions de stress et pour permettre la fin de la signalisation (Noctor et al., 2013). L'hypothèse ouvrant sur les futurs travaux du laboratoire est donc que le transport du GSSG vers la vacuole serait important, à la fois pour la sensibilisation au stress oxydant et la régulation du glutathion. Nous avons initié des expériences pour déterminer quels transporteurs sont physiologiquement les plus importants. Des analyses précédemment publiées par l'équipe montrent que les transporteurs du type ABCC sont de bons candidats pour remplir cette fonction (Noctor et al., 2013). Comme nous l'avons vu dans la partie introductive de ce manuscrit, 15 gènes codent pour les transporteurs du type ABCC chez *Arabidopsis* (Wanke et Kolukisaoglu, 2010). La quantification de leurs transcrits chez *cat2* a révélé que 9 parmi les 15 sont significativement induits comparés au type sauvage (Tableau 5).

Pendant ma thèse, dans le quadruple mutant *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* où l'accumulation du GSSG est fortement diminuée en comparaison au simple mutant *cat2*, j'ai également dosé quelques transcrits des ABCC-type induits chez *cat2* par rapport au sauvage. Les résultats ont montré une diminution significative de deux de ces gènes en comparaison au mutant *cat2* (Fig. 21). Ils restent toutefois toujours induits en comparaison au sauvage. Ces

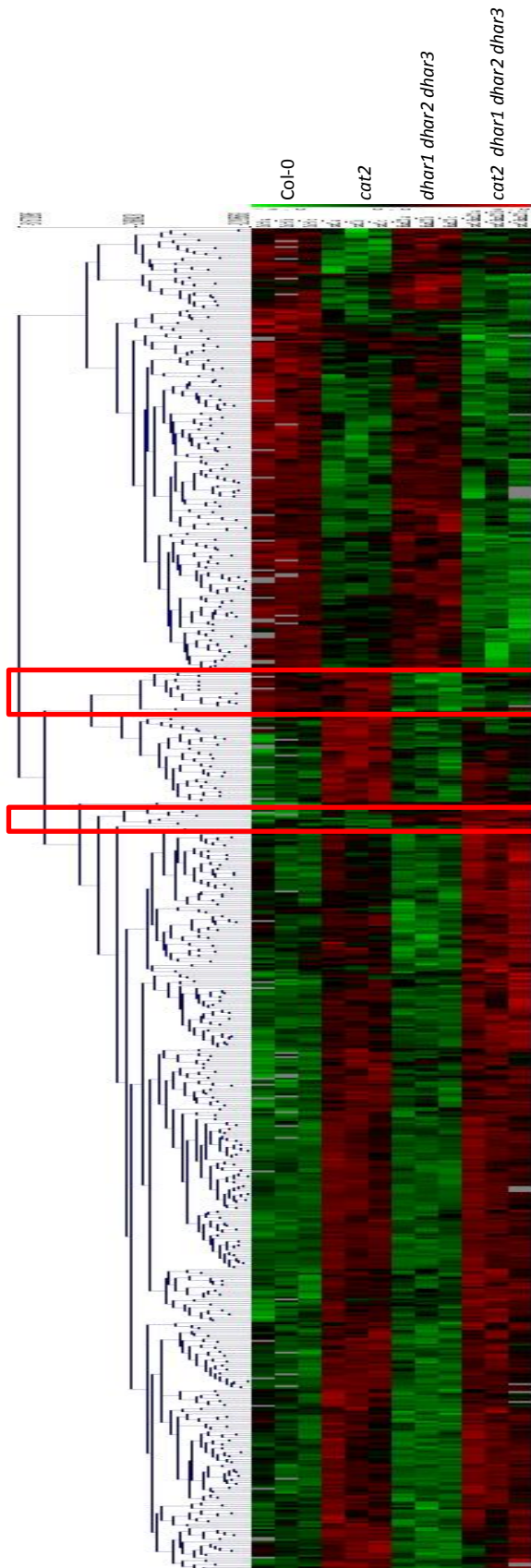


Figure 22 : Classification hiérarchique des valeurs d'expression obtenues par cDNA-AFLP pour les gènes significativement différents chez Col-0, *cat2*, *dhar1 dhar2 dhar3*, et *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*

Les plantes ont été cultivées sous une photopériode de 16 h avec un éclairage de $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les analyses ont été réalisées en collaboration avec Jenny Neukermans et Frank Van Breusegem (Plant Biology, VIB, Gand, Belgique).

Pour la comparaison entre Col-0 et le triple mutant : 5 gènes sont significativement induits dans le triple mutant avec une valeur- $p < 0,05$ puis 12 gènes significativement réprimés. Pour la comparaison entre *cat2* et le quadruple mutant : 13 gènes sont induits chez le quadruple mutant et 23 réprimés avec une valeur- $p < 0,05$.

résultats soulèvent alors la question supplémentaire de savoir si l'induction de ces transporteurs est directement liée ou non à la quantité de GSSG. En effet, une induction liée au potentiel redox du glutathion n'est pas à exclure (Noctor et al., 2013). Les outils roGFP nous renseignant sur le potentiel redox du glutathion des compartiments cellulaires, il sera intéressant de les exploiter dans le mutant *cat2*. Cette approche a déjà été initiée au laboratoire et sera par la suite, développée dans les mutants *cat2 cad2*, *cat2 gr1* et *cat2 dhar1 dhar2 dhar3* ainsi que dans les mutants affectés au niveau des transporteurs ABCC en cours d'analyse. En outre, il sera également intéressant d'effectuer une analyse transcriptomique plus poussée dans les mutants *dhar*. En effet, nos analyses préliminaires, via une approche de cDNA-AFLP, montrent des inductions ou répressions DHAR-dépendantes de certains gènes qui seront probablement intéressants d'étudier pour leur implication dans le contrôle du statut du glutathion (Fig. 22).

IV.1.2. Dégradation

D'autres résultats du laboratoire ont montré que les métabolites impliqués dans les voies de synthèse, de recyclage ou de dégradation du glutathion s'accumulent en réponse au stress oxydant chez le mutant *cat2* (Queval et al., 2009; Chaouch et al., 2012; Han et al., 2013a). Si de nombreuses études ont travaillé sur la synthèse et le recyclage du glutathion en situation de stress, sa dégradation reste peu explorée. Pourtant, les produits de dégradation du glutathion pourraient re-servir pour la néosynthèse et sa dégradation pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'état redox cellulaire. Les études antérieures sur la dégradation du glutathion ont été principalement réalisées en utilisant des approches biochimiques, souvent dans des cellules de tabac ; rarement sur des plantes entières (Steinkamp et Rennenberg, 1984, 1985 ; Steinkamp et al., 1987). Nous proposons, en perspective, de développer l'approche génétique chez *Arabidopsis* sur les quatre types d'enzymes qui peuvent initier la dégradation du glutathion : la PCS, la GGT, la GGC et l'OXP (voir Fig. 15 et Section I.2.5.3). Des mutants simples et multiples, notamment dans le fond *cat2*, sont déjà en cours d'obtention ou d'étude au laboratoire. Nos objectifs sont (1) de mettre en évidence la voie privilégiée dans la dégradation du glutathion, (2) évaluer l'impact de cette dégradation sur la signalisation redox et (3) évaluer son lien éventuel avec les phytohormones.

IV.2. Quelles améliorations apporter au modèle ?

Le modèle actuel, construit sur un jeu d'hypothèses explicites, constitue déjà une base solide de raisonnement sur le rôle et l'importance de différents acteurs dans la régulation du stress oxydant. Néanmoins, certaines améliorations pourront y être apportées. Nous avons déjà réalisé un certain nombre d'analyses de sensibilité qu'il sera intéressant d'approfondir dans le futur. En effet, faisant appel à de nombreux outils statistiques (régression, tests ...), ces analyses permettront de déterminer quels sont les paramètres du modèle qui y contribuent le plus, quels sont ceux qui n'ont pas d'influence et quels sont ceux qui interagissent au sein du modèle. Ces analyses complémentaires devraient permettre de le simplifier et de l'améliorer. La séquestration vacuolaire du GSSG est déjà prise en compte dans le modèle, nous envisageons d'intégrer la dégradation du glutathion en nous basant principalement sur les résultats des expérimentations en cours au laboratoire, compte-tenu du peu d'informations existantes sur ce point, dans la littérature.

De plus, nous envisageons d'intégrer le modèle dans notre modèle précédent MODD pour « Model of Ozone Deposition and Detoxification » (Tuzet et al., 2011). Le modèle MODD intègre les processus de dépôt et de détoxification de l'ozone troposphérique, qui comme nous l'avons vu dans la partie introductive, est l'un des polluants atmosphériques les plus dangereux, causant une perte conséquente de rendement dans les productions végétales. Cette perte est essentiellement due aux conséquences du stress oxydant engendré par l'ozone. Le modèle MODD s'applique à l'échelle de la parcelle, intégrant les différents facteurs de contrôle de la conductance stomatique et les échanges d'O₃ entre les feuilles et l'atmosphère. Il a été couplé à un modèle de continuum sol-plante-atmosphère qui intègre les échanges de masse et d'énergie au niveau des couverts végétaux (couverts agronomiques et forêts). Dans le modèle MODD, la partie détoxification est basée sur l'approche conceptuelle développée par Plöchl et al. (2000). L'ozone qui pénètre dans la cavité sous stomatique et les espaces intercellulaires diffuse rapidement dans le milieu aqueux des parois cellulaires où il réagit avec l'ASC apoplastique. Le DHA issu de l'oxydation de l'ASC peut facilement traverser le plasmalemm et entrer dans le cytosol. Une fois dans le cytosol, le DHA est régénéré en ASC qui peut diffuser à nouveau dans l'apoplaste. Selon ce concept, le taux de régénération de l'ASC dans l'apoplaste dépend directement du taux de régénération de l'ASC cytosolique et cette régénération est exprimée par une simple équation dépendant d'une constante de réaction de l'ASC avec le glutathion. Nous avons vu, au cours de cette thèse, que la voie ascorbate-glutathion est complexe et qu'elle est fortement sollicitée en conditions de stress oxydant. Clairement, grâce au modèle que nous avons établi, nous pourrions améliorer le modèle MODD, en intégrant la prise en compte des enzymes impliquées dans la voie ascorbate-glutathion. On pourrait envisager un projet plus ambitieux d'intégration du modèle dans sa totalité dans le modèle MODD, même si cet objectif est très difficile à atteindre, impliquant une paramétrisation très complexe.

IV.3. Etudes génétiques sur les MDHARs et enzymes génératrices de NADPH

Les simulations réalisées grâce à notre modèle ouvrent sur d'intéressantes perspectives à explorer sur le rôle des MDHAR NADPH-dépendantes dans le couplage de l'ascorbate et du glutathion. Des travaux complémentaires sur des mutants des différentes isoformes de la MDHAR, éventuellement croisés avec *cat2*, incluant des dosages des différents métabolites glutathion, ascorbate et NAD(P)H, sont actuellement en cours au laboratoire. Toujours selon le modèle, le couplage de l'ascorbate et du glutathion via les MDHARs serait étroitement lié à la disponibilité en NADPH. Cependant l'importance relative des différentes enzymes génératrices de NADPH reste incertaine (Foyer et Noctor, 2009). Il existe une multitude d'enzymes de type NADPH déshydrogénase à savoir les G6PDH, les GAPDH, les ICDH ou encore les ME, et l'activité de plusieurs d'entre elles est induite lors d'un stress oxydant, comme le stress salin pour la G6PDH (Valderrama et al., 2006). Ces enzymes ont déjà fait l'objet d'études au laboratoire à l'aide des mutants correspondants, éventuellement cumulés à la mutation *cat2* (Mhamdi et al., 2010c ; Dghim et al., 2013 ; Li et al., 2013 ; Mhamdi and Noctor, 2015). Des travaux complémentaires sont en cours sur de nouveaux mutants multiples affectés pour plusieurs ou toutes ces enzymes productrices de NADPH. Les analyses comportent des dosages de métabolites, de transcrits et d'activités enzymatiques.

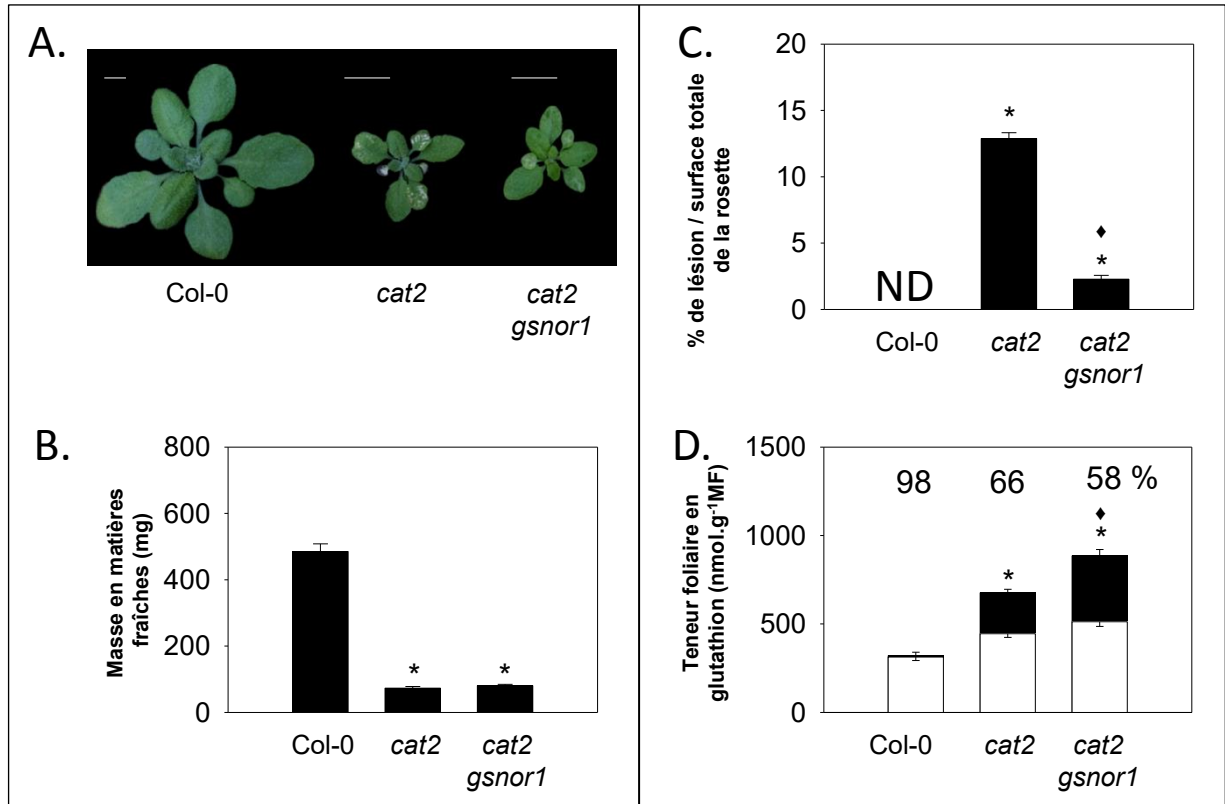


Figure 23 : Caractérisation du mutant *cat2 gsnor1*

A. Phénotype foliaire de *cat2 gsnor* comparé à *Col-0* et *cat2*, les traits blancs indiquent l'échelle. B. Masse en matières fraîches ; C. pourcentage de lésions par rapport à la surface totale de la rosette ; D. teneur en glutathion (les barres blanches représentent le GSH et les barres noires le GSSG). Les poids frais et les lésions foliaires ont été déterminés sur une moyenne de $\pm$ SE de quinze plantes sur trois répétitions. La teneur foliaire en glutathion a été mesurée sur une moyenne $\pm$ SE de trois réplicats biologiques. Les nombre au dessus de chaque barre représentent le pourcentage de glutathion réduit et les analyses statistiques utilisées s'appliquent au pool total du glutathion. Les plantes ont poussé trois semaines sous une photopériode de 16h avec un éclairage de $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. ND, non détecté ; * indique des différences significatives entre les mutants et *Col-0* avec une valeur- $p < 0,05$; ♦ indique des différences significatives entre *cat2* et *cat2 gsnor1* avec une valeur- $p < 0,05$.

IV.4. Interaction entre statut du glutathion, signalisation H_2O_2 et NO

Il est maintenant largement accepté que les modifications thiol-dépendantes sont parmi les mécanismes prépondérants de la signalisation redox, et que le glutathion y joue un rôle majeur (Noctor et al., 2017). Outre les conséquences directes des modifications du statut redox GSH:GSSG, le glutathion pourrait être indirectement impliqué via la nitrosylation des monomères de NPR1 qui dépend du GSNO. La nitrosylation de NPR1 conduit à son oligomérisation, supposée nécessaire pour prévenir la déplétion des protéines qui a lieu en situation de stress biotique (Tada et al., 2008). On sait que le NO et le H_2O_2 interagissent pour activer la réponse hypersensible et la résistance aux pathogènes (Delledonne et al., 1998, 2001), mais les mécanismes sous-jacents restent toujours méconnus. Cependant, les travaux récents ont établi que le S-nitrosoglutathione (GSNO) est un important réservoir de NO et peut agir comme un réactif physiologique des groupes thiol protéiques par la S-nitrosylation ou la S-glutathionylation (Lindermayr et al., 2010).

Au cours de cette thèse, les GSNOR ont été considérées comme des candidates glutathion-dépendantes pour le métabolisme du H_2O_2 (**Article 1**). J'ai alors examiné le rôle des GSNOR dans le contexte d'un stress oxydant (Fig. 23). Les résultats préliminaires montrent un effet marqué de la mutation *gsnor1* sur le phénotype de lésions foliaires de *cat2*. Contrairement aux mutants *dhar*, ce phénotype n'est pas en corrélation avec l'oxydation du glutathion qui est augmentée chez *cat2 gsnor1*. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives d'études liées au rôle possible du NO et ses interactions avec le stress oxydant.

Dans le contexte du doute sur l'existence d'une NOS chez les plantes, évoqué dans la partie introductive, trois protéines potentiellement impliquées dans la production ou le métabolisme du NO ont été proposées : la nitrate réductase (NR), la GSNOR et l'oxyde nitrique associé 1 (NOA1). Dans le but d'explorer les interactions entre le H_2O_2 , le glutathion et le NO, des études approfondies sont nécessaires chez le double mutant *cat2 gsnor1* mais aussi chez les mutants des autres voies productrices de NO. L'altération de la production de NO dans *noa1* semble être une conséquence indirecte de la perte de sa fonction chloroplastique principale (Flores-Pérez et al., 2008, Gas et al., 2009). Dans les mutants *noa1* RNAi, une diminution de la teneur en chlorophylles et de la capacité photosynthétique ont été observées et les analyses protéomiques quantitatives ont révélé une diminution de plusieurs enzymes photorespiratoires (Liu et al., 2010b). Par conséquent, ces lignées ainsi que le mutant *gsnor*, en particulier dans le fond génétique *cat2*, apparaissent comme des outils prometteurs pour élucider les interactions entre le NO et le H_2O_2 lors de la signalisation déclenchée par le stress oxydant.

Partie V. Matériels et méthodes utilisés

V. Matériels et méthodes utilisés

V.1. Matériels

V.1.1. Matériel végétal, conditions et milieux de culture

L'ensemble des travaux de ma thèse a été réalisé sur l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*. Toutes les lignées mutantes et transgéniques ont été obtenues dans le fond génétique Columbia-0 (Col-0) et sont listées dans le Tableau 1.1, Annexe 1. Les doubles, triples et quadruples mutants ont été obtenus par croisement. A l'exception des mutants *dhar* obtenus dans le cadre de la thèse de Shengchun Li (soutenance 2013), j'ai produit moi-même tous les autres mutants ainsi que les lignées complémentées. En fonction des objectifs de mon travail, les plantes ont été soumises à différentes conditions de culture.

V.1.1.1. Semis *in vitro*

Tout d'abord les graines ont été stérilisées avec une solution de stérilisation* dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml ou Falcon de 15 ml dépendant de la quantité de graines à stériliser en agitant pas plus de 10 min. Elles ont ensuite été rincées 2 fois avec de l'EtOH 95 % puis séchées sous hotte stérile à flux laminaire. Une fois les graines bien sèches, elles ont été semées *in vitro* sur des boîtes de Pétri contenant du ½ MS*. Le semis a été suivi d'une période de stratification de 48 h en chambre froide à l'obscurité avant d'être transférées en chambre de culture (16 h de photopériode à 20°C le jour et 18°C la nuit, entre 100-200 $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et 65 % d'hygrométrie ; ces conditions résumées dans le Tableau 1.2 ; Annexe 1).

***Solution de stérilisation** : 90 % (v/v) EtOH à 95 % et 10 % (v/v) d'une solution de Bayrochlore® (1 pastille dans 40 mL d'eau).

***Milieu ½ MS solide** : du nom de Murashige et Skoog (1962), avec 2,2 g.L^{-1} du mélange « Basalt Salt Mixture » (Duchefa Biochemie, M0221) solidifié avec 8 g.L^{-1} d'agar (Phyto-Agar HP696 ; Kalys), pH 5,7.

V.1.1.2. Semis en pots sur terreau

Le semis des graines a été fait à la volée sur terreau préalablement imbibé d'une solution contenant un fongicide, du Prévicur® (Bayer® CropScience) à 1 mL.L^{-1} , et un larvicide, du Trigard® (Syngenta®) à 0,2 g.L^{-1} . Les pots ont été recouverts d'une mini-serre afin de maintenir une forte humidité. Tout comme le semis *in vitro*, les graines ont été stratifiées pendant 48 h, puis placées soit en serre soit en chambre de culture ou en chambre de croissance en fonction des expérimentations. L'arrosage avec une solution nutritive* ou avec de l'eau a été réalisé deux fois par semaine.

***Mélange solution nutritive** : constitué d'un mélange de Plantprod (un engrais hydrosoluble) à 6,4 kg.23 L^{-1} , de Fertoligo ® 100 mL.23 L^{-1} (formulation liquide de fer 1,75% EDTA, de magnésium 1,65% EDTA et d'oligo éléments (Bore 0,4% ; Cuivre 0,3% ; Manganèse 0,3% ; Zinc 0,3% ; Molybdène 0,01%)) et du Ferty (un engrais soluble non coloré avec des oligo-éléments) selon la procédure Plan Ferti 10.

V.1.1.2.1. Culture des plantes en serre

Afin de réaliser des transformations stables d'*Arabidopsis thaliana* par la technique de « floral dip » (voir plus loin dans la section V.2.1.1.8, Clough & Bent, 1998) ou d'amplifier les graines d'une lignée, les plantules de 7

jours ont été repiquées sur terreau à raison de 4 plantules par pots carrés de 7 cm de côté, et ont été mises en culture à la serre (dont les conditions de cultures des plantes sont détaillées dans le Tableau 1.2 ; Annexe 1) jusqu'au stade de la floraison puis de la graine. Les graines ont alors ensuite été récoltées et conservées en chambre froide.

V.1.1.2.2. Culture des plantes en chambre de culture ou chambre de croissance

Pour les différentes analyses effectuées lors de ma thèse, la germination et le développement des plantules se déroulent dans des chambres dont les conditions d'hygrométrie, de photo- et de thermo-période ont été contrôlées (voir le Tableau 1.2 ; Annexe 1). Les teneurs en CO₂ et en ozone ont été artificiellement augmentées lors de certaines cultures (résumées dans le Tableau 1.3 ; Annexe 1).

V.1.2. Matériel bactérien

V.1.2.1. Souches bactériennes pour les clonages

La souche bactérienne d'*Escherichia coli* DH5α® (Invitrogen) a été utilisée comme hôte nécessaire aux étapes de clonage des inserts d'ADNc. Sa croissance est inhibée par l'expression du gène *ccdB* contenu dans tous les vecteurs d'entrée et de destination de la technologie GATEWAY. Elle est déficiente en endonucléases (*endA*), ce qui améliore la qualité des préparations d'ADN. D'autre part, la mutation qu'elle a sur le gène *recA*, la rendant déficiente pour la recombinaison homologe, évite les risques de mutations du plasmide au cours de sa préparation.

V.1.2.2. Souches bactériennes pour la transformation des plantes

Les transformations stables d'*Arabidopsis* ont été effectuées avec la souche bactérienne d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Koncz & Schell, 1986). Elle possède un plasmide Ti ("Tumor inducing") "désarmé" et ne porte plus que les gènes de virulence (*vir*) nécessaires au transfert de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale (Hellens et al., 2000). Cette souche possède les gènes de résistance à la gentamycine et la rifampicine.

V.1.2.3. Souche bactérienne pour les tests pathogènes

La souche Pst DC3000 (Pst), virulente sur *Arabidopsis* Col-0, a été utilisée dans cette approche. Il s'agit d'une souche de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), une bactérie à Gram négatif, hémibiotrophe, c'est-à-dire biotrophe aux premiers stades de l'infection puis nécrotrophe ensuite. Cette souche est responsable de la maladie de la moucheture sur la tomate et *Arabidopsis*. Elle possède les gènes de sélection pour la résistance à deux antibiotiques : la rifampicine et la kanamycine.

V.1.2.4. Plasmides et vecteurs de clonage

Le plasmide pENTR2B (Invitrogen) a été utilisé comme vecteur d'entrée. Ce plasmide présente un gène conférant la résistance des bactéries à la kanamycine. Puis une approche de complémentation chez les mutants *dhar* a été entreprise en se servant du vecteur pK7WG2. Les ADNc des différents DHAR ont également été transférés dans les deux plasmides binaires pB7WGF2 et pH7FWG2 pour une approche de localisation subcellulaire. Ces vecteurs permettent l'expression des inserts sous contrôle du promoteur 35S et la fusion des protéines en amont (pH7FWG2) ou en aval (pB7WGF2) de la protéine fluorescente « green fluorescent protein » (GFP). Le Tableau 1.4 et la Figure 1.1 en Annexe 1 résument les différents marqueurs de sélection pour ces différents vecteurs utilisés.

V.1.2.5. Amorces nucléotidiques

Les séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces pour les génotypages, les RT-PCRq et les clonages sont listées dans l'Annexe 2.

V. Matériels et méthodes utilisés

V.2. Méthodes

V.2.1. Techniques de biologie moléculaire

V.2.1.1. Techniques de clonage et transformation des plantes

V.2.1.1.1. Le système Gateway®

Le système de clonage Gateway® développé par Invitrogen est fondé sur la recombinaison site spécifique du phage λ et permet un clonage rapide d'une séquence d'intérêt dans de multiples vecteurs. Cette méthode de clonage se décompose en deux étapes : un premier clonage de la séquence d'intérêt dans un vecteur donneur, ici le pENTR2B, afin de créer un clone d'entrée (réalisé par restriction/ligation) et un deuxième clonage par recombinaison entre les vecteurs d'entrée et destinataire (pK7WG2, pH7FWG2, pB7WGF2) pour créer le vecteur destinataire contenant la séquence d'intérêt (réaction LR).

○ Préparation des séquences d'intérêt

Les ADNc des gènes *DHAR1*, *DHAR2* et *DHAR3* ont été respectivement amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir des clones RAFL19-03N19, RAFL09-83-E23 et RAFL19-84-K20 provenant de chez RIKEN « Arabidopsis Full-Length Clone Database » (<https://www.brc.riken.jp>). Pour cela, une polymérase haute-fidélité : la *Pfu* (Promega) a été utilisée et l'amplification a été réalisée à partir de 10 ng d'ADN matrice, en présence de 500 ng de chaque nucléotide (Tableau 2.1 Annexe 2), 200 μ M de dNTP, 1X de tampon *Pfu* et de 2 U d'enzyme dans un volume final de 50 μ L. Le programme utilisé est résumé dans le Tableau 3.1 (Annexe 3). Les amplifiats ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseur.

○ Préparation des clones d'entrée

Les vecteurs d'entrée ont été digérés avec des enzymes de restriction choisies (Promega), dans le tampon approprié à l'enzyme et la concentration adéquate selon les indications du fournisseur. Les produits de la digestion ont été déposés sur gel d'agarose 1% dans du tampon TAE*. Les bandes d'intérêt ont été découpées sous UV et purifiées à l'aide du kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseur. Une fois purifiés, les amplifiats des inserts et les produits de digestion plasmidique ont été ligués à l'aide de la T4 DNA ligase (Promega) dans un volume final de 10 μ L (tampon ligase 1X, 1 unité d'enzyme) avec un rapport insert/vecteur de 3/1 en nombre de molécules. La ligation s'est effectuée sur toute la nuit à 4°C. Ensuite, les produits de ligation ont été dessalés 45 min sur filtre de nitrocellulose 25 nm (Millipore®) et prêts à être utilisés pour transformer des bactéries électrocompétentes.

*TAE 50X : Tris- HCl 2 M, Na₂EDTA (pH8) 50 mM, acide acétique glacial 5,71 %

○ Préparation des clones de destination

Une fois dans le vecteur pENTR2B (Invitrogen), l'insert peut être transféré par recombinaison homologue dans les vecteurs binaires. Pour cela, 150 ng de chaque vecteur ont été mis en présence de 2 µL du LR clonase II enzyme mix® (Life technologies) dans un volume final de 10 µL. Après incubation toute la nuit à 25°C, 1 µL de protéinase K a été ajouté pour stopper la réaction. Après dialyse de 45min sur filtre de nitrocellulose 25nm (Millipore®), 1 µL du mélange réactionnel a été utilisé afin de transformer des bactéries électrocompétentes.

V.2.1.1.2. Transformation des bactéries par électroporation

L'électroporation permet d'introduire un ADN plasmidique dans une cellule hôte bactérienne par un choc électrique (Dower et al., 1988). Entre 50 et 100 ng de plasmide ou de produit de ligation ont été ajoutés à 50 µl de bactéries électrocompétentes. Le mélange a été placé dans une cuve à électroporation préalablement refroidie et soumise à un choc électrique de 2,5 kV (électroporateur *E. coli* Pulser, BioRad). Les bactéries ont été ensuite resuspendues rapidement dans un mélange de LB liquide* avec du glucose 20 % p/v, puis placées 1 h à 37°C pour *E.coli*, et 30°C pour les Agrobactéries sous agitation 150 rpm.

***Milieu LB liquide :** LB Broth Base (Life Technologies) 20 g.L⁻¹. Autoclavage 20min à 121°C.

V.2.1.1.3. Sélection des bactéries transformées et PCR sur colonie

Une fraction des bactéries transformées a été étalée sur du milieu LB solide*, supplémenté par le ou les antibiotique(s) approprié(s) et incubées à 37°C toute la nuit, ou pendant 2 jours à 30°C s'il s'agit d'Agrobactéries. Des PCR ont été directement effectuées sur les colonies bactériennes obtenues à partir des bactéries résistantes afin de vérifier qu'elles contiennent le vecteur et l'insert souhaités. Ces réactions de PCR ont été réalisées avec le kit GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase de chez Promega selon les indications du fournisseur adapté dans un volume final de 20 µL. Le programme utilisé est résumé dans le Tableau 3.2 (Annexe 3).

***Milieu LB solide :** LB agar (Life Technologies) 32g.L⁻¹. Autoclavage 20 min à 121°C.

V.2.1.1.4. Electrophorèse des produits de PCR

Les produits de PCR ont été séparés par migration sur gel d'agarose 0,8 % dans du tampon TAE* (voir section V.2.1.1.1), et visualisés sous UV.

V.2.1.1.5. Extraction d'ADN plasmidique

Après vérification par PCR sur colonies, les bactéries résistantes ont été utilisées pour ensemercer une culture liquide de 5 mL de milieu LB avec le ou les antibiotique(s) approprié(s), et incubée sous agitation à température adéquate. Au bout de 24 h, les bactéries ont été centrifugées 5min à 5000 g et le culot bactérien a été utilisé pour

extraire le plasmide d'intérêt à l'aide du kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseur.

V.2.1.1.6. Digestion des plasmides

Afin de contrôler la présence des inserts par analyse de la cartographie de restriction, les plasmides ont été digérés avec des enzymes adéquates selon les indications du fournisseur. Le produit de la digestion a été déposé sur un gel d'agarose 1 % dans du tampon TAE* (voir section V.2.1.1.1) et la quantité d'ADN a été estimée grâce au marqueur de poids moléculaire quantifié (Smart Ladder, Eurogentec).

V.2.1.1.7. Séquençage

La bonne intégration des séquences a été confirmée par séquençage. Les fragments d'ADN ont été séquencés sur les deux brins par la société MWG- Biotech.

V.2.1.1.8. Obtention des lignées transgéniques

Avant transformation des plantes, les constructions dans *Agrobacterium tumefaciens* ont été vérifiées par PCR sur colonies et séquencées. Une préculture de 5 mL a été par la suite réalisée à 30°C sous agitation (150 rpm) sur une nuit, et 300 mL de LB contenant de la rifampicine (10 mg/L) et l'antibiotique approprié ont été ajoutés à cette préculture. La culture a été remplacée sous agitation, et le lendemain, elle a été centrifugée 25min à 5000 g. Le culot a été repris dans 150 mL de saccharose 5 % (p/v) et 0,05 % (v/v) de Silwet (Witco Europe SA) un agent mouillant qui permet de faciliter la pénétration des agrobactéries dans les interstices cellulaires. Les plantes ont été transformées avec cette suspension selon la méthode dite de « floral-dip » (Clough and Bent 1998): les inflorescences ont été trempées avec la suspension d'agrobactéries 3min puis placées sous cloche pendant 2 jours afin de créer une atmosphère saturée en humidité et maintenues en serre jusqu'à maturité des siliques. Les graines des plantes transformées ont été semées *in vitro* en présence de l'agent de sélection adéquat (Tableau 1.4, Annexe 1) afin d'identifier celles ayant intégré la construction d'intérêt. Des réactions de PCR ont été systématiques dans la vérification de génération en génération jusqu'à obtention des lignées homozygotes.

V.2.1.2. Criblage par PCR des insertions d'ADN- T dans les mutants d'*Arabidopsis thaliana*

V.2.1.2.1. Extraction de l'ADN génomique

Le protocole d'extraction d'ADN génomique utilisé a été adapté à partir d'Edwards et al. (1991). Une jeune feuille de rosette a été broyée dans 400 µL de tampon d'extraction pour ADN*. Le mélange a été centrifugé pendant 10min à 11000 g et 4°C, puis 200 µL de surnageant ont été prélevés, auxquels ont été ajoutés 200 µL d'isopropanol. Après une deuxième centrifugation de 10min à 11000 g et température ambiante, les culots ont été rincés avec 1 mL d'éthanol 70 % (v/v), séchés, puis resuspendus dans 50 µL d'eau stérile.

**Tampon d'extraction pour ADN : Tris 200mM pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5 % (v/v).*

V.2.1.2.2. PCR de géotypage

Les PCR ont été réalisées sur 2 μ L de chaque échantillon d'ADN génomique de plante afin de tester la présence ou non de l'ADN-T dans le gène d'intérêt. Les séquences des amorces ainsi que les conditions de PCR sont décrites dans le Tableau 2.2 (Annexe 2) et Tableau 3.2 (Annexe 3) respectivement. Les réactions ont été réalisées dans un volume de 25 μ L avec le kit GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase de chez Promega selon les indications du fournisseur. Les produits d'amplification ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % dans du tampon TAE* (voir section V.2.1.1.1).

V.2.1.3. Mesure de l'expression des gènes

V.2.1.3.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 60-100 mg de feuilles broyées en poudre très fine dans un mortier refroidi à l'azote liquide. 1mL de TRIzol Reagent (Invitrogen) a été ajouté et le mélange a été vortexé jusqu'à complète homogénéisation, puis incubé 5min à température ambiante. Une étape de séparation de phase a été effectuée en présence de 200 μ L de chloroforme puis le tout centrifugé (11000 rpm, à 4°C pendant 15min), suivi d'une étape de précipitation des polysaccharides avec 500 μ L d'isopropanol sur le surnageant. Le mélange a été incubé 10 min à température ambiante et centrifugé (11000 rpm, à 4°C, 10 min). Le culot contenant les ARN totaux a été récupéré et lavé avec 500 μ L d'éthanol 75 % deux fois, et laissé à sécher. Ce culot a été ensuite resuspendu dans 20 μ L d'eau stérile et incubé pendant 10 min à 65°C puis mis à 4°C toute une nuit. Le lendemain, les ARN ont été dosés par spectrophotométrie à 260 et 280 nm par un Nanodrop (type ND1000) et conservés à -80°C jusqu'à utilisation. A la suite de l'extraction d'ARN, un traitement à la DNase a été nécessaire afin de s'affranchir des résidus d'ADN. Le kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega) a été utilisé. Aux 2 μ L d'ARN à 1 μ g. μ L⁻¹ ont été ajoutés 1X de RQ1 RNase-Free DNase.

V.2.1.3.2. Transcription- inverse des ARNm

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 1 μ g d'ARN, avec le kit SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR d'Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>), selon le protocole du fabricant. Les oligoDT ont été hybridés sur les ARNm, qui ont été ensuite reverse-transcrits, puis la RNase a été ajoutée en fin de réaction pour dégrader les ARN et ne garder que les ADNc néo-synthétisés.

V.2.1.3.3. RT-PCR quantitative

Les RT-PCR quantitatives ont été réalisées sur des plaques de 96 puits dans le thermocycleur LightCycler 480 avec le kit LightCycler 480 SYBR Green I Master de Roche (<http://www.roche-applied-science.com>). Les réactions se font avec 10 ng de matrice et 250 nM de chaque oligonucléotide (Tableau 2.3, Annexe 2), dans un

volume final de 10 μ L. Les étapes étaient : une dénaturation à 95°C pendant 10min, puis 50 cycles : 95°C pendant 15s, 60°C pendant 20s, et 72°C pendant 15s. A la fin de l'amplification, une dénaturation a été effectuée par un chauffage de 65 à 95°C, qui permet de vérifier la spécificité de l'amplification. La quantification relative, calculée via la technique des dérivées secondes, a été réalisée avec le logiciel LightCycler 480 Software.

V.2.1.3.4. cDNA-AFLP

Les fragments d'ADNc ont été amplifiés en utilisant 24 combinaisons d'oligonucléotides : (BstT1-Mse12, BstT1-Mse14, BstT1-Mse21, BstT1-Mse24, BstT2-Mse42, BstT3-Mse14, BstT3-Mse21, BstT3-Mse33, BstT3-Mse44, BstT4-Mse11, BstT4-Mse12, BstT4-Mse13, BstT4-Mse14, BstT4-Mse21, BstT4-Mse22, BstT4-Mse23, BstT4-Mse31, BstT4-Mse32, BstT4-Mse33, BstT4-Mse34, BstT4-Mse41, BstT4-Mse42, BstT4-Mse43, BstT4-Mse44; Vuylsteke et al., 2007). Les produits de PCR ont été séparés sur des gels de Polyacrylamide qui ont été séchés et exposés sur des films Kodak BioMax MS films et numérisés avec un PhosphorImager 445 SI (Amersham Biosciences, <http://www.amersham.com>). L'intensité des bandes correspondant aux fragments d'ADNc amplifiés a été quantifiée et normalisée avec le logiciel QuantarPRO AFLP (Keygene Products, <http://www.keygene.com>), puis traitée avec le logiciel ARRAY-AN (Vandenabeele et al., 2003). Une analyse de variation (ANOVA, $p < 0,05$) a été ensuite effectuée sur les valeurs normalisées pour révéler des différences significatives dans l'expression ainsi qu'une classification hiérarchique des gènes.

V.2.2. Techniques de biochimie

V.2.2.1. Mesure des activités extractibles des enzymes par spectrophotométrie

Les activités de toutes les enzymes ont été mesurées dans au moins deux réplicats techniques (dosages d'un même extrait) et trois réplicats biologiques (extraits indépendants).

V.2.2.1.1. Extraction des protéines hydrosolubles

Le dosage des activités extractibles de l'APX, de la CAT, de la DHAR et de la GR peut se faire dans le même extrait (Noctor et al., 2016); 150 mg de feuilles ont été broyées dans de l'azote liquide, puis entre 50 - 100 mg de PVP, un adsorbant des composés phénoliques, et 1,5 mL du tampon d'extraction N°1* des protéines hydrosolubles ont été ajoutés. L'extrait a été centrifugé 10 min à 14 000 rpm et 4°C et 500 μ L de surnageant ont été dessalés sur une colonne NAP-5 pré-équilibrés, et élués avec 1 mL du tampon d'extraction. Pour le dosage d'activité extractible de la MDHAR; le protocole a été adapté de Murshed et al., 2008 dans lequel 250 mg de feuilles ont été broyées dans de l'azote liquide, puis entre 50 - 100 mg de PVP et 500 μ L de tampon d'extraction N°2* ont été ajoutés.

***Tampon d'extraction N°1 :** NaH_2PO_4 0,1 M, EDTA 1 mM pH 7,5 ; Ascorbate 1 mM fraîchement ajouté pour chaque extraction quand l'APX était à doser.

***Tampon d'extraction N°2 :** Tampon MES 50 mM pH 6, KCl 40 mM CaCl_2 , 2 mM et Ascorbate 1 mM fraîchement ajouté pour chaque extraction.

V.2.2.1.2. Dosage des protéines totales

La quantité de protéines a été déterminée par la technique de Bradford (Bradford, 1976), un dosage colorimétrique avec le réactif Biorad (<http://www.bio-rad.com>). Le principe de cette méthode est basé sur la liaison du Bleu de Coomassie G-250 avec les liaisons peptidiques ; ce qui entraîne un changement du maximum d'absorption du colorant à 595 nm. Une aliquote de 10 μL de l'extrait a été additionnée à 40 μL d'eau et 950 μL du réactif. Une incubation de 10 min a été respectée pour chaque manipe car la coloration ne se développe que dans un temps minimum de 5min et ne dépassant pas les 30 min. L'absorbance a été lue à 595 nm. La gamme étalon a été réalisée avec des concentrations croissantes de BSA.

V.2.2.1.3. Ascorbate peroxydase

L'activité extractible de l'APX a été mesurée par la diminution de l'absorbance mesurée à 290 nm à 25°C au fur et à mesure que l'ascorbate s'oxyde. Pour cette mesure, 890 μL du tampon de dosage* a été mélangé à 50 μL d'ascorbate à 10 mM et 50 μL d'extrait. La réaction a été amorcée en ajoutant 10 μL de H_2O_2 à 20 mM soit 0,2 mM dans le volume final. Un contrôle a été à effectuer, sans extrait, afin de corriger la mesure de l'oxydation via une réaction chimique entre H_2O_2 et le substrat. La réaction a été suivie pendant 5min et calculée sur 2min. L'activité extractible de l'enzyme a été calculée selon le coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

**Tampon de dosage : NaH_2PO_4 0,1 M, EDTA 1 mM pH 7,5.*

V.2.2.1.4. Catalase

L'activité extractible de la catalase a été mesurée par la diminution d'absorbance du H_2O_2 dismuté à 240 nm à 25°C (Veljovic-Jovanovic et al., 2001). Dans une cuve en quartz, 790 à 940 μL de tampon de dosage ont été mélangés à 20 μL de H_2O_2 à 2 M pour donner une concentration finale de 40 mM. L'absorbance à 240 nm doit être stable, avant d'amorcer la réaction en ajoutant 50 à 200 μL d'extrait. L'absorbance a été ensuite mesurée pendant 2 min. L'activité extractible de la catalase a été calculée sur les 30 premières secondes de la cinétique à partir du coefficient d'extinction molaire du H_2O_2 $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

V.2.2.1.5. Glutathion réductase

La GR réduit le GSSG en GSH en oxydant le NADPH. L'activité extractible de la GR a été mesurée par la diminution d'absorbance du NADPH à 340 nm à 25°C (Veljovic_Jovanovic et al., 2001). Dans une cuve, 880 à 930 μL de tampon de dosage, 10 μL de NADPH 10 mM et 50 à 100 μL d'extrait ont été mélangés. La réaction a été amorcée par l'ajout de 10 μL de GSSG 50 mM, puis la décroissance d'absorbance du NADPH à 340 nm pendant 2 à 3 min a été mesurée. L'activité extractible de la GR a été calculée sur la première minute de la cinétique à partir du coefficient d'extinction molaire du NADPH $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

V.2.2.1.6. Déhydroascorbate réductase

L'activité extractible de la déhydroascorbate réductase a été mesurée en suivant l'évolution de l'absorbance à 265 nm à 25°C quand le DHA a été réduite en ascorbate. Il faut effectuer un contrôle (sans extrait) pour corriger la réduction chimique de DHA par le GSH et soustraire des taux obtenus avec ceux des extraits. Pour chaque extrait, 905 à 915 µL de tampon de dosage (pH 7), 50 µL de DHA à 4 mM, 25 µL de GSH à 100 mM ont été mélangés avec 10 à 20 µL d'extrait. La lecture a été faite sur 5min et le calcul sur 2 min à l'aide du coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{265} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

V.2.2.1.7. Monodéhydroascorbate réductase

Le protocole de dosage a été adapté de Murshed et al. (2008). Comme la MDHAR réduit le MDHA en ascorbate en oxydant le NAD(P)H, son activité extractible a été mesurée par la diminution de l'absorbance du NAD(P)H à 340 nm à 25°C. Puisque le MDHA est un radical instable, ce substrat est généré à partir de l'ascorbate pendant le dosage par l'action de l'ascorbate oxydase. Dans une cuve, 925 µL du tampon de dosage* ont été mélangés à 50 µL d'extrait, 10 µL d'ascorbate à 250 mM, 10 µL NAD(P)H à 25 mM. Le dosage a été amorcé par l'ajout de 0,4U d'ascorbate oxydase. La lecture a été faite sur 2min et l'activité extractible a été calculée selon le coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

**Tampon de dosage pour la MDHAR : HEPES 50 mM pH 7,6*

V.2.2.2. Analyse des métabolites

V.2.2.2.1 Dosage par spectrophotométrie de l'ascorbate et du glutathion

Le protocole d'extraction et dosage des métabolites utilisé a été adapté à partir de Queval et Noctor, 2007. Un lecteur de microplaque (type Multiskan spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) a été utilisé pour ce dosage car cet appareil permet de faire des lectures de plusieurs échantillons à la fois tout en effectuant des triplicats techniques.

○ *Extraction acide*

Les métabolites ont été extraits en broyant 100 mg de feuilles en poudre fine dans de l'azote liquide. Un mL de HCl 0,2 N a été ajouté. Le mélange a été centrifugé 10min à 14 000 rpm et 4°C. Un aliquote de 500 µL du surnageant a été récupéré, puis neutralisé en ajoutant 50 µL de NaH_2PO_4 200 mM pH 5,6 et un volume suffisant de NaOH 0,2 M (environ 400 µL) pour atteindre un pH entre 5 et 6.

○ *Ascorbate réduit*

Le dosage de l'ascorbate a été réalisé par mesure directe de son absorbance à 265 nm. Sa forme réduite a été dosée à partir de 40 µL de l'extrait neutralisé dans un volume final de 200 µL contenant 100 mM NaH_2PO_4 au

pH 5,6. Une première mesure de l'absorbance a été effectuée, puis 0,2 U d'ascorbate oxydase a été ajouté et la diminution de l'absorbance qui équivaut à l'oxydation en DHA a été suivie pendant 5min à 25°C. La différence entre les deux valeurs permet d'estimer la quantité d'ascorbate réduit. Le coefficient d'extinction molaire de l'ascorbate $\varepsilon_{265} = 14 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a été utilisé pour calculer la concentration en ascorbate.

○ *Ascorbate total*

La totalité de l'ascorbate (réduit et oxydé) a été mesurée en incubant 100 μL d'extrait neutralisé pendant 30 min à température ambiante en présence de 140 μL de NaH_2PO_4 120 mM pH 7,5 et 10 μL de DTT 25 mM avant le dosage. Cette procédure convertit le DHA présent dans l'extrait en ascorbate.

○ *Glutathion*

Le dosage du glutathion a été réalisé par couplage enzymatique. Le principe a été basé sur une réaction de recyclage en suivant la réduction du DTNB (ou réactif d'Ellman, Sigma- Aldrich®) à 412 nm par le glutathion en présence de la glutathion réductase (GR, Roche Applied Science) et de NADPH. Pour mesurer le glutathion total (réduit et oxydé), 10 μL d'extrait neutralisé ont été mélangés à du NaH_2PO_4 100 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, DTNB 0,6 mM, NADPH 0,5 mM dans un volume final de 200 μL . La réaction a été initiée par l'ajout de 0,2 U de GR et suivie à 412 nm pendant 5min à 25°C. La concentration en glutathion a été calculée à partir de standards de GSH.

○ *GSSG*

Le GSSG a été dosé de la même manière mais nécessite un prétraitement au 2-VPD. Cette procédure conduit à une liaison irréversible entre le 2-VPD et le groupement thiol des GSH présents dans l'extrait neutralisé ; de ce fait, seul le GSSG présent dans l'extrait peut participer au dosage. Pour ce faire, 200 μL d'extrait ont été incubés à 30min à température ambiante avec 2 μL de 2-VPD, puis centrifugé 2x15min à 14 000 rpm et 4°C. Les standards de GSSG ont été traités de la même manière que les extraits.

V.2.2.2.2 Dosage de l'acide salicylique par HPLC

○ *Système d'acquisition des profils métaboliques*

Le système HPLC (chromatographie liquide à haute performance; Waters®- Alliance®) utilisé dans cette étude a été composé d'un injecteur automatique (W717; Waters®), un système de pompage (W1525; Waters®), un détecteur UV à barrette de diodes (PDA; Photo Diode Array; Waters® 2996) et un détecteur de fluorescence à longueurs d'ondes multiples (W2475, Waters®). Le PDA permet l'acquisition, toutes les 2s, d'un spectre d'absorbance comprise entre $\lambda = 200 \text{ nm}$ et $\lambda = 600 \text{ nm}$, il n'a pas été utilisé dans cette étude. Le détecteur de fluorescence permet d'utiliser des longueurs d'onde d'excitation de 200 nm $\lambda =$ à $\lambda = 890 \text{ nm}$, et sert à mesurer

des composés qui sont dotés d'une étiquette fluorescente ou qui, comme l'acide salicylique (SA), fluorescent d'une manière intrinsèque.

- ***Extraction de l'acide salicylique***

Pour extraire le SA, des échantillons de feuilles d'environ 160 mg ont été broyés en poudre fine dans de l'azote liquide auxquels ont été ajoutés 1,5 mL de méthanol 90 % et 30 μ L d'une solution de SA radiomarké au ^{14}C (SA*; 1 nCi, 54 mCi.mmol $^{-1}$) afin d'estimer le rendement d'extraction. Il est à noter que cette quantité de SA* ajoutée était inférieure au seuil de détection du SA en HPLC. Le mélange a été ensuite transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL, vortexé pendant 15min et centrifugé 10min à 14 000 rpm à 4°C. Le surnageant a été récupéré tandis que le culot a été de nouveau extrait avec 500 μ L de méthanol 100 %, vortexé et centrifugé 10 min à 14000 rpm à 4°C. Les deux surnageants ont été mélangés puis séchés dans un speed-vac et stockés à température ambiante à l'obscurité.

- ***Analyse de l'acide salicylique par HPLC***

Une fois bien secs, les échantillons ont été repris dans 200 μ L de tampon de charge* et 50 μ L ont été injectés dans l'HPLC. La colonne utilisée était une C18 phase inverse; 4 μ m; 3,9 x 150 mm (Nova-Pak Waters®). Les solvants d'élution ont été constitués du tampon A* et du tampon B*, le débit était de 1 mL.min $^{-1}$. Le gradient linéaire utilisé était : 0 min : 97 % de A, 10 min : 97 % de A, 20 min : 20 % de A, 30 min : 20 % de A, 32 min : 97 % de A, 37 min : 97 % de A. Les métabolites ont été ensuite détectés en fluorescence dont la longueur d'onde d'excitation était de $\lambda_{\text{ex}} = 315$ nm et la longueur d'onde d'émission de $\lambda_{\text{em}} = 405$ nm).

***Tampon de charge:** 90 % en acétate de sodium 20 mM, pH 5 et 10 % en acétonitrile.

***Tampon A:** acétate de sodium 20 mM, pH 5.

***Tampon B:** acétonitrile.

- ***Traitement et comparaison des données***

L'intégration des aires des pics des chromatogrammes obtenus, réalisée avec le logiciel EmpowerTM software system (Waters®), a été effectuée manuellement. Les aires des pics ont été ensuite corrigées par rapport au rendement d'extraction et rapportées à la masse de matière fraîche. La quantification absolue du SA a été réalisée à partir d'une gamme étalon obtenue avec un standard de SA.

- ***Calcul du rendement de l'extraction par comptage radioactif***

Une aliquote de 60 μ L de chaque échantillon repris dans le tampon de charge a été mélangé à 1,4 mL de liquide scintillant pour le comptage du SA*. La radioactivité a été mesurée en utilisant un compteur à scintillation (type LS 6000IC, Beckman®). Chaque échantillon a été analysé trois fois pendant dix minutes, puis le rendement a été obtenu par calcul de la moyenne des trois comptages. La radioactivité de 30 μ L d'une solution de SA* a été prise pour le rendement à 100 %.

V.2.3. Techniques d'approches physiologiques

V.2.3.1. Stress biotique, tests de sensibilité au *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

V.2.3.1.1. Cultures des bactéries

La culture des bactéries a été réalisée par étalement d'un stock glycérolé sur milieu LB solide sélectif contenant $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicine et $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de kanamycine. Cette culture a été réalisée deux jours dans une étuve à 30°C puis repiquée dans un grand volume de 200 mL de milieu LB liquide supplémenté toujours de ces deux antibiotiques. La culture liquide a été incubée pendant une nuit à 30°C sous agitation 150 rpm. Le jour de l'inoculation, les bactéries ont été sédimentées une première fois par centrifugation (10min à 3000 g) dans des tubes de 50 mL. Le culot bactérien obtenu a été lavé dans environ 50 mL de MgCl_2 10 mM. Les bactéries ont été sédimentées une deuxième fois par centrifugation, le culot a été resuspendu dans un faible volume de MgCl_2 . La concentration en bactéries dans la suspension a été évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm.

V.2.3.1.2. Inoculations de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Les inoculations avec la souche virulente (Pst DC3000) de la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ont été réalisées sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* âgées de trois semaines cultivées en chambre de culture. Un jour avant l'inoculation, les plantes ont été placées sous humidité saturante à l'aide d'une mini-serre de sorte que les stomates soient bien ouverts le jour de l'infiltration des agents pathogènes. L'inoculation a été réalisée à l'aide d'une seringue de 1 mL sans aiguille en infiltrant la face abaxiale des feuilles avec une suspension bactérienne à 10^5 cfu.mL^{-1} . Les feuilles inoculées ont été repérées avec un trait fin de feutre sur leur pétiole. Environ 6 plantes ont été inoculées sur 3 à 5 feuilles. Des plantes témoins ont été infiltrées en parallèle avec une solution de MgCl_2 à 10 mM stérile (mock).

V.2.3.1.3. Échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé pour chaque condition : chaque génotype, chaque traitement, chaque temps de la cinétique d'infection. Des disques foliaires de $0,5 \text{ cm}^2$ ont été collectés sur les feuilles inoculées à l'aide d'un emporte-pièce stérilisé entre chaque échantillon. Pour chaque point de temps de la cinétique d'infection, entre 4 et 6 échantillons ont été constitués en combinant deux disques foliaires de différentes plantes traitées dans les mêmes conditions. Ces deux disques constituent un échantillon et ont été placés dans des tubes contenant une bille en métal stérile et 400 μL d'eau stérile. L'ensemble a été broyé au broyeur à billes (1min à 20 Hz). Des dilutions sériées du broyat ont été réalisées de dix en dix. Chaque dilution a été ensuite étalée indépendamment sur du milieu LB agar supplémenté en rifampicine et kanamycine (100 et $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement). Après incubation 48 h à 30°C , les colonies ont été dénombrées à la dilution appropriée (Katagiri et al., 2002).

V.2.3.2. Stress abiotiques

V.2.3.2.1. Traitement à l'Ozone

○ *Description du dispositif*

L'ozone était produit à l'aide de deux générateurs (OZ500 Fischer, Bonn, Allemagne, et CMG3-3 Innovatec II, Rheinbach, Allemagne) reliés à des bouteilles d'oxygène pur. Au sein de ces deux générateurs, la formation d'une molécule d'ozone (O_3) se réalise par dissociation et réassociation des molécules de dioxygène (O_2) en présence d'un arc électrique. L'ozone ainsi produit a été injecté dans le circuit de ventilation des chambres de fumigation. La régulation de ce flux a été assurée par des débitmètres, et la concentration en ozone dans l'ensemble du dispositif a été mesurée en continu à l'aide d'un analyseur UV (O341M, Environment S.A., Paris, France) associé à une station d'acquisition informatique. Les chambres de fumigation sont des enceintes climatisées de 2,88 m³. L'éclairement, assuré par cinq lampes à vapeur de sodium (Son-T Agro, Philips, Eindhoven, Pays-Bas), permet d'atteindre de 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ au niveau des plantes. La température et le degré d'hygrométrie ont été mesurés deux fois par heure dans chaque chambre en même temps que la concentration en ozone. Des filtres à charbon actif permettent d'éliminer l'ozone de l'air extérieur envoyé aux chambres de fumigation. La concentration en ozone a été ainsi limitée à une valeur maximale de 10 ppb dans les chambres témoins. L'air enrichi en ozone a été lui filtré à la sortie des chambres avant rejet dans l'atmosphère.

○ *Procédure de fumigation et échantillonnage*

Après trois semaines en chambre de culture, les plantes ont été transférées et réparties dans huit chambres de fumigation, à raison de soixante-quatre plantes par chambre soit 512 plantes au total. Les plantes ont été maintenues en chambre de fumigation dans des conditions environnementales identiques à celles régnant dans les chambres de culture. A l'issue de cette période d'acclimatation, la moitié des plantes, soit 256 plantes réparties dans quatre chambres de fumigation, a été traitée à l'ozone pendant deux jours. Les 256 plantes restantes, réparties dans les quatre autres chambres de fumigation, conservent les mêmes conditions de culture avec une atmosphère filtrée dépourvue d'ozone et forment le lot témoin. En chambre de culture comme en chambre de fumigation, les plantes ont été régulièrement arrosées avec de l'eau courante. La période de fumigation débute une heure après le début de la photopériode. Les plantes traitées ont été exposées à une concentration en ozone de 350 ± 10 ppb pendant 7 h (de 10 h à 17 h). La période de fumigation dure 2 jours. Après le traitement à l'ozone, les plantes ont été soumises à 24 h de période de récupération. Les plantes ont été ensuite photographiées pour la quantification de lésions, puis pesées et congelées rapidement dans de l'azote liquide et conservées à -80° C jusqu'à leur analyse.

V.2.3.2.2. Traitement au paraquat (methyl viologène)

Le paraquat est un herbicide qui agit au niveau du photosystème I des membranes thylakoïdales des chloroplastes. Cette expérience a été effectuée en culture *in vitro*, le semis a été effectué sur milieux avec ou sans

paraquat (0 ; 0,01 et 0,1 μM) jusqu'à 14 jours à raison de 45 plantes par génotype étalées sur 3 expériences. Les plantes ont été photographiées pour le phénotypage racinaire.

V.2.3.2.3. Traitement au 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT)

Le 3-AT est un inhibiteur efficace des catalases. Pour cette expérience, une solution de 3-AT à 2 mM a été pulvérisée sur des plantes de 21 jours à raison de 15 plantes par génotype. Les plantes ont été photographiées pour la quantification de lésions, puis pesées et congelées rapidement dans de l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à analyse. Cette expérience a été répétée 4 fois.

V.2.3.2.4. Exposition au cadmium

Le cadmium est un polluant toxique en raison de son influence négative sur les systèmes enzymatiques cellulaires. En effet, la toxicité due au cadmium peut résulter de sa liaison aux groupes thiols des protéines entraînant l'inhibition de leur activité ou la destruction de leur structure. Le Cd impacte aussi négativement sur le GSH. Lors de cette expérience, les semis ont été effectués *in vitro*. Les milieux ont été supplémentés ou non de cadmium (0 ; 5 ou 10 μM de Cd). Les plantes ont ensuite été photographiées au bout de 14 jours. Une étude phénotypique au niveau racinaire a été réalisée. L'expérience a été réalisée sur environ 45 plantes par génotype.

V.2.3.2.5. Exposition au NaCl et au mannitol

Un stress salin provoque en premier lieu une diminution du potentiel hydrique de la solution du milieu, menaçant ainsi l'approvisionnement en eau des plantes. Par ailleurs, du fait de la toxicité des ions Na^+ , la pénétration du NaCl dans les tissus peut perturber le fonctionnement physiologique des cellules. Pour ces expériences, les graines ont été semées *in vitro*, sur des plaques de milieu seul (témoin), ou des milieux contenant 50 et 100 mM de NaCl. Dans le but de différencier les effets de la toxicité ionique et de l'hyperosmolarité du traitement par du NaCl, la réponse à un traitement hyperosmotique équivalent a été étudiée en traitant les plantes par 100 et 200 mM de mannitol. Les semis ont été cultivés pendant 14 jours dans ces conditions, une étude phénotypique au niveau foliaire et racinaire a été réalisée et ces expériences ont été répétées 3 fois.

V.2.4. Techniques d'imagerie

V.2.4.1. Observation des feuilles à la loupe binoculaire

En plus des photos des rosettes entières, chaque feuille de chaque plante a été découpée et photographiée avec une loupe binoculaire (SVII, Zeiss) en utilisant un éclairage refroidi par fibre optique (épiscopique) ou un éclairage diascopique. L'équipement a été associé à un système d'acquisition comprenant un ordinateur PC relié à une caméra CCD (Sony) et son boîtier de commande. La caméra a été pilotée par le logiciel d'acquisition Axiovision 1.1 (Zeiss).

V.2.4.2. Détection de la mort cellulaire

V.2.4.2.1. Coloration des cellules mortes au bleu de trypan

Les feuilles ont été incubées une nuit à 37°C dans une solution de bleu de trypan*, un colorant azoïque qui est exclu des cellules vivantes, permettant ainsi de colorer spécifiquement les cellules ou tissus morts. Les feuilles ont été par la suite décolorées avec 3 bains successifs de 24 h dans une solution de chloral hydrate* chauffée à 70°C pendant une heure pour accélérer la décoloration. Puis elles ont été montées entre lame et lamelle puis observées et photographiées.

**Solution de bleu de trypan : 10 mL d'aquaphénol, 10 mL d'acide lactique, 10 mL de glycérol, 10 mL d'eau bidistillée et 2,5 mg de bleu trypan.*

**Solution de chloral hydrate : 8 g de chloral hydrate (Sigma- Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 2 mL d'eau distillée et 1 mL de glycérol.*

V.2.4.2.2. Observations des échantillons au microscope

Les photos des colorations au bleu de trypan ont été réalisées avec un microscope (AZ100-Nikon) et les images acquises avec une caméra numérique refroidie (DsRi1, Nikon) pilotée par le logiciel NIS-D du même constructeur.

V.2.4.3. Localisation subcellulaire, microscopie confocale à balayage laser

La localisation subcellulaire a été effectuée sur des plantules âgées de 10 jours montées entre lame et lamelles (Knittelglass, de 1 mm d'épaisseur). L'imagerie a été réalisée avec un microscope confocal à balayage Leica SP8 en utilisant un objectif d'immersion d'huile PLAN APO 63x (Numerical Aperture, 1.4). La GFP a été excitée avec un laser à 488 nm et détectée dans une fenêtre de détection de 493 nm à 530 nm. Le Mitotracker Red (CMTMR, Invitrogen) a été excité avec un laser à 578 nm et détecté dans une fenêtre de détection de 582 nm à 609 nm. Les deux canaux de détection ont été enregistrés en utilisant des détecteurs hybrides (Hamamatsu) avec une acquisition séquentielle. L'autofluorescence de la chlorophylle a été excitée à 633 nm et détectée à 698-748 nm.

V.2.5. Techniques d'analyses in silico

V.2.5.1. Sites de bases de données génomiques

Tout au long de la réalisation de mon travail de thèse, j'ai utilisé différents sites de bases de données génomiques, d'outils de cartographie, de catalogues de banque de mutants.

- Le site TAIR pour « *The Arabidopsis Information Resource* » (<http://www.arabidopsis.thaliana.org/>). Il s'agit d'un site qui dispose d'une base de données de génétique et de biologie moléculaire sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*
- Le site MIPS pour « *Munich Information Center for Protein Sequence* » (<http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/plant/athal/>). Il s'agit également d'un site de ressources génomiques dédiées à *Arabidopsis thaliana*
- Le site internet : <http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/HTML/index.shtml> disponible en France, qui fournit des bases de données intégratives sur le génome d'*Arabidopsis thaliana*
- Le site SIGnAL pour « *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* » (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) qui permet de visualiser la position des gènes, des insertions d'ADN- T et des ADNc disponibles auprès de la communauté scientifique
- Le site de NASC pour « *The European Arabidopsis Stock Centre* » (<http://arabidopsis.thaliana.info/>). Il s'agit d'un site de catalogues de ressources génétiques qui permet en particulier de commander des lignées mutantes d'*Arabidopsis thaliana*.

V.2.5.2. Genevestigator, un site de bases de données transcriptomiques

Pour les études transcriptomiques, je me suis servie du site internet Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch>) qui fournit des profils d'expression d'après des bases de données d'expression génique, pour des gènes d'intérêt chez plusieurs espèces, notamment en fonction des différents organes, du stade de développement, en réponse à des stimuli ou chez différents mutants (Zimmermann et al., 2004).

V.2.5.3. Brenda

Le site internet Brenda (<http://www.brenda-enzymes.org/>) a constitué une riche base de données utile aux études enzymologiques. Notamment lors de la définition des différents paramètres enzymatiques pour la modélisation. Il référence les paramètres cinétiques d'un grand nombre d'enzymes, pour plusieurs organismes dont certaines espèces végétales.

V.2.5.4. Tests statistiques

Différentes analyses statistiques ont été utilisées lors de ma thèse : le test de Student qui a été effectués dans la majorité de mes traitements de données. Les tests ANOVA suivi d'un test de Tukey. Puis l'utilisation du logiciel MeV (Multiexperiment Viewer). Ce logiciel constitue une interface souple couplée à un large choix d'outils statistiques (classification hiérarchique, ANOVA, carte de chaleur, etc.).

V.2.5.5. IQmaterials

Le logiciel IQmaterials est un ce logiciel de traitement et d'analyse d'images. Dans cette étude, il a été utilisé pour quantifier les lésions foliaires.

V.2.5.6. Image J

Le logiciel ImageJ est également un logiciel de traitement et d'analyse d'image. Je l'ai utilisé pour mesurer la longueur des racines principales pour le phénotypage racinaire de mes plantes soumise à différentes contraintes *in vitro*.

V.2.5.7. Fortran 90

Fortran 90 a été la version du langage de programmation Fortran utilisée dans la conception de notre modèle soumis à la publication dans la sous-partie **II.4** de cette thèse.

Partie VI. Bibliographie

- **Abdelgawad H, Zinta G, Hegab MM, Pandey R, Asard H, Abuelsoud W** (2016) High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. *Front Plant Sci* 7: 276
- **Ajithkumar IP, Panneerselvam R** (2014) ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* roth under drought stress. *Cell Biochem Biophys* 68: 587–595
- **Allen JF, Hall DO** (1973) Superoxide reduction as a mechanism of ascorbate-stimulated oxygen uptake by isolated chloroplasts. *Biochem Biophys Res Commun* 52: 856–862
- **Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) “Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants”. *J Exp Biol* 531: 1331–1341
- **Angelini R, Cona A, Federico R, Fincato P, Tavladoraki P, Tisi A** (2010) Plant amine oxidases "on the move": an update. *Plant Physiol Biochem*. 48: 560–556
- **Arnaud C, Bonnot C, Desnos T, Nussaume L** (2010) The root cap at the forefront. *C R Biol* 333: 335–343
- **Asada K** (1992) Ascorbate peroxidase-hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85: 235–241
- **Asada K** (1999) The water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601–639
- **Asada K** (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 2391–2396
- **Asada K, Kiso K, Yoshikawa K** (1974) Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *J Biol Chem* 249: 2175–2181
- **Asada K, Takahashi M** (1987) Production and scavenging of active oxygen species in photosynthesis. In D Kyle, C Osmond, C Arntzen, eds, *Photoinhibition*. Elsevier Science Publishers, New York, pp 227–287
- **Ashraf M, Harris JC** (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci* 166: 3–16
- **Bailey-Serres J, Mittler R** (2006) Special issue on reactive oxygen species. *Plant Physiol* 141, 311–508
- **Baldacci-Cresp F, Chang C, Macourt M, Deborde C, Hopkins J, Lecomte P, Bernillon S, Brouquisse R, Moing A, Abad P, Herouart D, Puppo A, Favory B, Frendo P** (2012). (Homo) glutathione deficiency impairs root-knot nematode development in *Medicago truncatula*. *PLoS Pathogen* 8 : 1002471
- **Ball L, Accotto G, Bechtold U, Creissen G, Funck D, Jimenez A, Kular B, Leyland N, Mejia-Carranza J, Reynolds H, Karpinski S, Mullineaux PM** (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2448–2462
- **Baniulis D, Hasan SS, Stofleth JT, Cramer WA** (2013) Mechanism of enhanced superoxide production in the cytochrome b(6)f complex of oxygenic photosynthesis. *Biochem* 52: 8975–8983
- **Bashandy T, Guilleminot J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y, Reichheld JP** (2010) Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *Plant Cell* 22: 376–391
- **Bauwe H, Hagemann M, Kern R, Timm S** (2012) Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 15: 269–275
- **Baxter A, Mittler R, Suzuki N** (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* 65: 1229–1240

- **Bela K, Horváth E, Gallé Á, Szabados L, Tari I, Csiszár J** (2015) Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *J Plant Physiol* 176: 192–201
- **Benekos K, Kissoudis C, Nianiou-Obeidat I, Labrou N, Madesis P, Kalamaki M, Makris A, Tsaftaris A** (2010) Overexpression of a specific soybean GmGSTU4 isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants. *J Biotechnol* 150: 195–201
- **Benschop JJ, Mohammed S, O’Flaherty M, Heck AJ, Slijper M, Menke FL** (2007) Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Mol Cell Proteomics* 6: 1198–1214
- **Bick JA, Setterdahl AT, Knaff DB, Chen Y, Pitcher LH, Zilinskas BA, Leustek T** (2001) Regulation of the plant-type 5'-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress. *Biochemistry* 40: 9040–9048
- **Biemelt S, Keetman U, Albrecht G** (1998). Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol.* 116: 651–658
- **Bienert GP, Chaumont F** (2014) Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1840: 1596–1604
- **Bienert, GP, Heinen RB, Berny MC, Chaumont F** (2014) Maize plasma membrane aquaporin ZmPIP2;5, but not ZmPIP1;2, facilitates transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1838 : 216–222
- **Blee KA, Jupe SC, Richard G, Zimmerlin A, Davies DR, Bolwell GP** (2001) Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Mol Biol* 47: 607-20.
- **Bloem E, Haneklaus S, Salac I, Wickenhäuser P, Schnug E** (2007) Facts and fiction about sulphur metabolism in relation to plant-pathogen interactions. *Plant Biol* 9: 596–607
- **Bloem E, Riemenschneider A, Volker J, Papenbrock J, Schmidt A, Salac I, Haneklaus S, Schnug E** (2004) Sulphur supply and infection with *Pyrenopeziza brassicae* influence L-cysteine desulphydrase activity in *Brassica napus* L. *J Exp Bot* 55: 2305–2312
- **Blokhina O, Fagerstedt KV** (2010) Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Plant Mitochondria: Origin and Redundant Regulatory Systems. *Physiol Plant* 138: 447–462
- **Blomster T, Salojärvi J, Sipari N, Brosché M, Ahlfors R, Keinänen M, Overmyer K, Kangasjärvi J** (2011) Apoplastic reactive oxygen species transiently decrease auxin signaling and cause stress-induced morphogenic response in Arabidopsis. *Plant Physiol* 157: 1866–1883
- **Blum R, Beck A, Korfte A, Stengel A, Letzel T, Lendzian K, Grill E** (2007) Function of phytochelatinsynthase in catabolism of glutathione-conjugates. *Plant J* 49: 740–749
- **Blum R, Meyer KC, Wünschmann J, Lendzian KJ, Grill E** (2010) Cytosolic action of phytochelatinsynthase. *Plant Physiol* 153: 159–169
- **Bond W, Zaloumis NP** (2016) The deforestation story: testing for anthropogenic origins of Africa's flammable grassy biomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371: 1–9
- **Borisova MM, Kozuleva MA, Rudenko NN, Naydov IA, Klenina IB, Ivanov BN** (2012) Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins. *Biochim Biophys Acta* 1817: 1314–1321

- **Bowler C, Van Montagu M, Inzé D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 43:83–116
- **Branco-Price C, Kaiser KA, Jang CJ, Larive CK, Bailey-Serres J** (2008) Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 56: 743–755
- **Bratt A, Rosenwasser S, Meyer A, Fluhr R** (2016) Organelle redox autonomy during environmental stress. *Plant Cell Environ* 39: 1909–1919
- **Bréhélin C, Meyer EH, de Souris JP, Bonnard G, Meyer Y** (2003) Resemblance and dissemblance of *Arabidopsis* type II peroxiredoxins: similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. *Plant Physiol* 132: 2045–2057
- **Brosché M, Blomster T, Salojärvi J, Cui F, Sipari N, Leppälä J, Lamminmäki A, Tomai G, Narayanasamy S, Reddy RA, Keinänen M, Overmyer K, Kangasjärvi J** (2014) Transcriptomics and functional genomics of ROS-induced cell death regulation by RADICAL-INDUCED CELL DEATH1. *PLoS Genet.* 10(2): e1004112
- **Bruggeman Q, Raynaud C, Benhamed M, Delarue M** (2015) To die or not to die? Lessons from lesion mimic mutants. *Front Plant Sci* 6: 24
- **Brunetti P, Zanella L, De Paolis A, Di Litta D, Cecchetti V, Falasca G, Barbieri M, Altamura MM, Costantino P, Cardarelli M** (2015) Cadmium-inducible expression of the ABC-type transporter AtABCC3 increases phytochelatin-mediated cadmium tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 66: 3815–3829
- **Brunkard JO, Runkel AM, Zambryski PC** (2015) Chloroplasts extend stomules independently and in response to internal redox signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 10044–10049
- **Buwalda F, Stulen I, De Kok LJ, Kuiper PJC** (1990) Cysteine, γ -glutamylcysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. II. Glutathione accumulation in detached leaves exposed to H₂S in the absence of light is stimulated by the supply of glycine to the petiole. *Physiol Plant* 80: 196–204
- **Byrne RS, Hansche R, Mendel RR, Hille R** (2009) Oxidative half-reaction of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase: generation of superoxide by a peroxisomal enzyme. *J Biol Chem* 284: 35479–35484
- **Cairns NG, Pasternak M, Wachter A, Cobbett CS, Meyer AJ** (2006) Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol.* 141: 446–455
- **Caplan JS, Hager RN, Megonigal JP, Mozdzer TJ** (2015) Global change accelerates carbon assimilation by a wetland ecosystem engineer. *Environ Res Lett* 10: 115006.
- **Cassin-Ross G, Hu J** (2014) A simple assay to identify peroxisomal proteins involved in 12-oxo-phytodienoic acid metabolism. *Plant Signal Behav* 9: e29464
- **Caverzan C, Bonifacio A, Carvalho FEL, Andrade CMB, Passaia G, Schünemann M, Maraschin FS, Martins MO, Teixeira FK, Rauber R, Margis R, Silveira JA, Margis-Pinheiro M** (2014) The knockdown of chloroplastic ascorbate peroxidases reveals its regulatory role in the photosynthesis and protection under photo-oxidative stress in rice. *Plant Sci* 214:74–87
- **Chae L, Sudat S, Dudoit S, Zhu T, Luan S** (2009) Diverse transcriptional programs associated with environmental stress and hormones in the *Arabidopsis* receptor-like kinase gene family. *Mol Plant* 2: 84–107

- **Chamnongpol S, Willekens H, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W** (1996). Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant J* 10 491–503
- **Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann H, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W** (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5818–5823
- **Chaouch S, Noctor G** (2010) Myo-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal H₂O₂. *New Phytol* 188: 711–718
- **Chaouch S, Queval G, Noctor G** (2012) *AtRbohF* is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 69: 613–627
- **Chater C, Peng K, Movahedi M, Dunn JA, Walker HJ, Liang YK, McLachlan DH, Casson S, Isner JC, Wilson I, Neill SJ, Hedrich R, Gray JE, Hetherington AM** (2015) Elevated CO₂-induced responses in stomata require ABA and ABA signaling. *Curr Biol* 25: 2709–2716
- **Chawla S, Jain S, Jain V** (2013) Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Biochem Biotechnol* 22: 27–34
- **Cheeseman JM** (2006) Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *J Exp Bot* 57: 2435–2444
- **Chen JH, Jiang HW, Hsieh EJ, Chen HY, Chien CT, Hsieh HL, Lin TP** (2012) Drought and salt stress tolerance of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. *Plant Physiol* 158: 340–351
- **Chen R, Sun S, Wang C, Li Y, Liang Y, An F, Li C, Dong H, Yang X, Zhang J, Zuo J** (2009) The *Arabidopsis* PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Res* 19: 1377–1387
- **Chen Z, Gallie DR** (2006) Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development and function. *Plant Physiol* 142: 775–787
- **Cheng L, Kellogg III EW, Packer L** (1981) Photoinactivation of catalase. *Photochem Photobiol* 34: 125–129
- **Chew O, Whelan J, Millar AH** (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J Biol Chem* 278: 46869–46877
- **Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI** (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J* 18: 3325–3333
- **Clifton R, Millar AH, Whelan J** (2006) Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim Biophys Acta* 1757/ 730–741
- **Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159–182
- **Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B** (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant J* 16: 73–78

- **Coll NS, Eppe P, Dangi JL** (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ* 18: 1247–1256
- **Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P** (2006) Function of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci* 11: 80–88
- **Considine MJ, Foyer CH** (2014) Antioxid Redox regulation of plant development. *Redox Signal* 21:1305–26
- **Cooney RV, Harwood PJ, Custer LJ, Franke AA** (1994) Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ Health Perspect* 102: 460–462
- **Corpas FJ, Barroso JB, Palma JM, del Río LA** (2009) Peroxisomes as key organelles in the metabolism of reactive oxygen species, reactive nitrogen species and reactive sulfur species. In S Terlecky, V Titorenko, eds, *Emergent Functions of the Peroxisome*. Research Signpost, Kerala, India, pp 97–124
- **Corpas FJ, Fernández-Ocaña A, Carreras A, Valderrama R, Luque F, Esteban FJ, Rodríguez-Serrano M, Chaki M, Pedrajas JR, Sandalio LM, del Río LA, Barroso JB** (2006) The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiol* 47: 984–994
- **Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, Valderrama R, Barroso JB, del Río LA** (2008) Peroxisomal xanthine oxidoreductase: characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology* 165: 1319–1330
- **Correa-Aragunde N, Foresi N, Lamattina L** (2015) Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells: regulation of ascorbate peroxidase as a case study. *J Exp Bot* 66 : 2913–2921
- **Cosgrove DJ** (2016) Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics and the action of wall-modifying enzymes. *J Exp Bot* 67: 463–476
- **Couee I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A** (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 57: 449–459
- **Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori G, Wellburn F, Baker N, Wellburn A, Mullineaux P** (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* 11: 1277–1292
- **Cummins I, Wortley DJ, Sabbadin F, He Z, Coxon CR, Straker HE, Sellars JD, Knight K, Edwards L, Hughes D, Kaundun SS, Hutchings SJ, Steel PG, Edwards R** (2013) Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 5812–5817
- **Cvetkovska M, Vanlerberghe GC** (2012) Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentrations of superoxide and nitric oxide. *New Phytol* 195: 32–39
- **Cvetkovska M, Vanlerberghe GC** (2013) Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species. *Plant Cell Environ* 36: 721–732
- **Danon A, Miersch O, Felix G, Camp RG, Apel K** (2005) Concurrent activation of cell death-regulating signalling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 41: 68–80
- **Das K, Roychoudhury A** (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci* 2:53
- **Das P, Nutan KK, Singla-Pareek SL, Pareek A** (2015) Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles. *Front Environ Sci* 2: 70

- **Dat JF, Inzé D, Van Breusegem F** (2001) Catalase-deficient tobacco plants: tools for in planta studies on the role of hydrogen peroxide. *Redox Rep* 6: 37–42
- **Daudi A, Cheng Z, O'Brien JA, Mammarella N, Khan S, Ausubel FM, Bolwell GP** (2012) The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity. *Plant Cell* 24: 275–287
- **Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R** (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 268–281
- **Davoine C, Falletti O, Douki T, Iacazio G, Ennar N, Montillet JL, Triantaphylides C** (2006) Adducts of oxylipin electrophiles to glutathione reflect a 13 specificity of the downstream lipoxygenase pathway in the tobacco hypersensitive response. *Plant Physiol* 140: 1484–1493
- **De Clercq I, Vermeirssen V, Van Aken O, Vandepoele K, Murcha MW, Law SR, Inzé A, Ng S, Ivanova A, Rombaut D, van de Cotte B, Jaspers P, Van de Peer Y, Kangasjärvi J, Whelan J, Van Breusegem F** (2013) The membrane bound NAC transcription factor ANAC013 functions in mitochondrial retrograde regulation of the oxidative stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25: 3472–3490
- **De Jong AJ, Yakimova ET, Kapchina VM, and Woltering EJ** (2002) A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta* 214: 537–545
- **De Torres Zabala M, Zhai B, Jayaraman S, Eleftheriadou G, Winsbury R, Yang R, Truman W, Tang S, Smirnov N, Grant M** (2016) Novel JAZ co-operativity and unexpected JA dynamics underpin *Arabidopsis* defence responses to *Pseudomonas syringae* infection. *New Phytol* 209: 1120–1134
- **del Río LA, Donaldson RP** (1995) Production of superoxide radicals in glyoxysomal membranes from castor bean endosperm. *J Plant Physiol* 146: 283–287
- **del Río LA** (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *J Exp Bot* 66: 2827–2837
- **del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB, López-Huertas E, Palma JM** (2014) Function of peroxisomes as a cellular source of nitric oxide and other reactive nitrogen species. In: Nasir Khan M, Mobin M, Mohammad F, Corpas FJ, eds. *Nitric oxide in plants: metabolism and role in stress physiology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 33–55
- **del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB** (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 53: 1255–1272
- **del Río LA, Fernández VM, Rupérez FL, Sandalio LM, Palma JM** (1989) NADH induces the generation of superoxide radicals in leaf peroxisomes. *Plant Physiol* 89: 728–731
- **del Río LA, López-Huertas E** (2016) ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant Cell Physiol* 57: 1364–1376
- **del Río LA, Sandalio LM, Palma JM** (1990) A new cellular function for peroxisomes related to oxygen free radicals? *Experientia* 46: 989–992
- **del Río LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P, Corpas FJ** (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic Biol Med* 13: 557–580
- **Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13454–13459

- **Demidchik V** (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ Exper Bot* 109: 212-228
- **Destro T, Prasad D, Martignago D, Bernet IL, Trentin AR, Renu IK, Ferretti M, Masi A** (2010) Compensatory expression and substrate inducibility of γ -glutamyl transferase GGT2 isoform in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 62: 805-814
- **Dghim AA, Mhamdi A, Vaultier MN, Hasenfratz-Sauder MP, LE Thiec D, Dizengremel P, Noctor G, Jolivet Y** (2013) Analysis of cytosolic isocitrate dehydrogenase and glutathione reductase 1 in photoperiod-influenced responses to ozone using *Arabidopsis* knockout mutants. *Plant Cell Environ* 36: 1981–1991
- **Dietz KJ** (2016) Thiol-based peroxidases and ascorbate peroxidases: why plants rely on multiple peroxidase systems in the photosynthesizing chloroplast? *Mol Cells* 39: 20–25
- **Dietz KJ, Mittler R, Noctor G** (2016) Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. *Plant Physiol* 171: 1535-1539
- **Dinakar C, Abhaypratap V, Yearla SR, Raghavendra AS, Padmasree K** (2010) Importance of ROS and antioxidant system during the beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Planta* 231: 461–474
- **Distefano S, Palma JM, McCarthy I, del Río LA** (1999) Proteolytic cleavage of plant proteins by peroxisomal endoproteases from senescent pea leaves. *Planta* 209: 308–313
- **Dixon DP, Davis BG, Edwards R** (2002) Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277: 30859–30869
- **Dixon DP, Edwards R** (2009) Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *J Biol Chem* 284: 21249–21256
- **Dixon DP, Edwards R** (2010) Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book* 8: e0131
- **Dixon DP, Edwards R** (2010) Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *Biol Chem* 285: 36322–36329
- **Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ, Edwards R** (2009) Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *J Exp Bot* 60: 1207–1218
- **Dixon DP, Skipsey M, Grundy NM, Edwards R** (2005) Stress-induced protein S-glutathionylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138: 2233–2244
- **Dixon RM, Hosking BJ, Egan AR** (2003) Effects of oilseed meal and grain-urea supplements fed infrequently on digestion in sheep. 1. Low quality grass hay diets. *Anim Feed Sci Technol*, 110: 75–94
- **Du YY, Wang PC, Chen J, Song CP** (2008) Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol* 50: 1318–1326
- **Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Witte CP, Schulze WX, Romeis T** (2013) Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 8744–8749
- **Dunand C, Crèvecoeur M, Penel C** (2007) Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: Possible interaction with peroxidases. *New Phytol* 174: 332–341

- **Dutilleul C, Driscoll S, Cornic G, De Paepe R, Foyer CH, Noctor G** (2003) Tobacco leaves require functional mitochondrial complex I for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiol* 131: 264–275
- **Dwyer J R, Smith D M** (2012) Cummer S A. High-energy atmospheric physics: Terrestrial gamma-ray flashes and related phenomena. *Space Sci Rev* 173:133–196
- **Edwards R, Blount JW, Dixon RA** (1991) Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures. *Planta* 184: 403–409
- **Edwards R, Cummins I, Dixon DP, Freitag-Pohl S, Skipsey M** (2011) Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab Rev* 43: 266e280
- **Edwards R, Dixon DP** (2005) Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401: 169e186
- **Edwards R, Dixon DP, Skipsey M** (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71: 338e350
- **Einstein A** (1905) “On a Heuristic Point of View about the Creation and Conversion of Light,” *Annalen der Physik* 17: 132–148
- **Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Shibahara T, Inanaga S, Tanaka K** (2007) Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* 225: 1255–1264
- **Escamez S, Tuominen H** (2014) Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: when a suicidal cell arranges its own corpse removal. *J Exp Bot* 65: 1313-1321
- **Farmer EE, Mueller MJ** (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu Rev Plant Biol* 64: 429–450
- **Fath A, Bethke PC, Jones RL** (2001) Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiol* 126: 156–166
- **Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ** (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8054–8059
- **Feierabend J, Engel S** (1986) Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves. *Arch Biochem Biophys* 251: 567–576
- **Feierabend J, Streb P, Schmidt M, Dehne S, Shang** (1996) Expression Of catalase and its relation to light stress and stress tolerance. In: Grillo S, Leone A (eds) *Physical Stresses in plants*. Springer, Berlin, Pp 223±234
- **Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* 18, 265–276
- **Fendrych M, Van Hautegeem T, Van Durme M, Olvera-Carrillo Y, Huysmans M, Karimi M, Lippens S, Guérin CJ, Krebs M, Schumacher K, Nowack MK** (2014) Programmed cell death controlled by ANAC033/SOMBRERO determines root cap organ size in Arabidopsis. *Curr Biol* 24: 931–940
- **Feng Y, Yao ZI, Klionsky DJ** (2015) How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 25(6): 354-63
- **Finka A, Cuendet AF, Maathuis FJ, Saidi Y, Goloubinoff P** (2012) Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance. *The Plant Cell* 24: 3333–3348

- **Finlayson-Pitts BJ, Pitts JN** (1997) Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* 276: 1045–1051
- **Fischer BB, Hideg E, Krieger-Liszkay A** (2013) Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxid Redox Signal* 18: 2145–2162
- **Ford KL, Cassin A, Bacic A** (2011) Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. *Front Plant Sci* 2: 44
- **Foyer C, Lelandais M, Galap C, Kuner KJ** (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol* 97: 863–872
- **Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G** (2010) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Biology* 60: 455–484
- **Foyer CH, Halliwell B** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25
- **Foyer CH, Halliwell B** (1977) Purification and properties of dehydroascorbate reductase from Spinach leaves. *Phytochemistry* 16: 1347–1350
- **Foyer CH, Noctor G** (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* 119: 355–364
- **Foyer CH, Noctor G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875
- **Foyer CH, Noctor G** (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Sign* 11: 861–905
- **Foyer CH, Noctor G** (2011) Ascorbate and glutathione : the heart of the redox hub. *Plant Physiol* 155: 2–18
- **Foyer CH, Noctor G** (2013) Redox signaling in plants. *Antioxid Redox Signal* 18: 2087–2090
- **Foyer CH, Noctor G** (2015) Defining robust redox signalling within the context of the plant cell. *Plant Cell Environ* 38: 239
- **Foyer CH, Noctor G** (2016) Stress-triggered redox signaling: what's in pROSpect? *Plant Cell Environ* 39: 951–964
- **Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S** (2001) The functions of intercellular and intracellular glutathione transport systems. *Trends in Plant Science* 6 : 486–492
- **Fridovich I** (1986) Superoxide dismutase. *Adv Enzymol* 58: 61–97
- **Frugoli JA, Zhong HH, Nuccio ML, McCourt P, McPeck MA, Thomas TL, McClung CR** (1996) Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* 112: 327–336
- **Gallie DR** (2012) The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *J Exp Bot* 64: 433–443
- **Gao X, Yuan HM, Hu YQ, Li J, Lu YT** (2014) Mutation of *Arabidopsis* CATALASE2 results in hyponastic leaves by changes of auxin levels. *Plant Cell Environ* 37: 175–188
- **Gapper C and, Dolan L** (2006) Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol* 141: 341–345

- **Garcia-Mata C, Wang J, Gajdanowicz P, Gonzalez W, Hills A, Donald N, Riedelsberger J, Amtmann A, Dreyer I, Blatt MR** (2010) A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K⁺ channel of *Arabidopsis* by the reactive oxygen species H₂O₂. *J Biol Chem* 285: 29286–29294
- **Garrison WM** (1987) Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem Rev* 87: 381–398
- **Gatzek S, Wheeler GL, Smirnoff N** (2002) Antisense suppression of l-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated l-galactose synthesis. *Plant J* 30: 541–553
- **Gechev T, Willekens H, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W, Toneva V, Minkov I** (2003) Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J Plant Physiol* 160:509–515
- **Gechev TS, Hille J** (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J Cell Biol* 168: 17–20
- **Ghanta S, Bhattacharyya D, Sinha R, Banerjee A, Chattopadhyay S** (2011) *Nicotiana tabacum* overexpressing γ -ECS exhibits biotic stress tolerance likely through NPR1-dependent salicylic acid-mediated pathway. *Planta* 233: 895–910
- **Ghezzi P** (2005) Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res* 39: 573–580
- **Glazebrook J, Ausubel FM** (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8955–8959
- **Göhre V, Jones AME, Sklenar J, Robatzek S, Weber APM** (2012) Molecular crosstalk between PAMP-triggered immunity and photosynthesis. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 1083–1092
- **Gomez L, Vanacker H, Buchner P, Noctor G, Foyer CH** (2004) The intercellular distribution of glutathione synthesis and its response to chilling in maize. *Plant Physiol* 134: 1662–1671
- **Goyer A, Johnson TL, Olsen LJ, Collakova E, Shachar-Hill Y, Rhodes D, Hanson AD** (2004) Characterization and Metabolic Function of a Peroxisomal Sarcosine and Pipecolate Oxidase from *Arabidopsis*. *J B Chem* 279: 16947–16953
- **Grace SC, Logan BA** (1996) Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiol* 112: 1631–1640
- **Groden D, Beck E** (1979) H₂O₂ destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 546: 426–435
- **Gromes R, Hothorn M, Lenherr ED, Rybin V, Scheffzek K, Rausch T** (2008) The redox switch of gamma-glutamylcysteine ligase via a reversible monomer-dimer transition is a mechanism unique to plants. *Plant J* 54: 1063–1075
- **Grzam A, Martin MN, Hell R, Meyer AJ** (2007) γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 581: 3131–3138
- **Güllner G, Tóbiás I, Fodor J, Kömives T** (1999) Elevation of glutathione level and activation of glutathione-related enzymes affect virus infection in tobacco. *Free Radic Res* 31(Suppl.) S155–S161
- **Gunawardena AHLAN, Greenwood JS, Dengler NG** (2004) Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during leaf development. *Plant Cell* 16: 60–73
- **Gunawardena AHLAN, Sault K, Donnelly P, Greenwood JS, Dengler NG** (2005) Programmed cell death and leaf morphogenesis in *Monstera obliqua*. *Planta* 221: 607–618

- **Ha S-B, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS** (1999) Phytochelatase synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11:1153–1163
- **Hakansson AP, Roche-Hakansson H, Mossberg AK, Svanborg C** (2011) Apoptosis-like death in bacteria induced by HAMLET, a human milk lipid-protein complex. *PLoS ONE* 6:e17717
- **Halliwell B** (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16: 33–50
- **Halliwell B, Gutteridge JMC** (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th Edition, Oxford University Press, New York
- **Han Y, Chaouch S, Mhamdi A, Queval G, Zechmann B, Noctor G** (2013a) Functional analysis of *Arabidopsis* mutants points to novel roles for glutathione in coupling H₂O₂ to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxid Redox Signal* 18: 2106–2121
- **Han Y, Mhamdi A, Chaouch S, Noctor G** (2013b) Regulation of basal and oxidative stress-triggered jasmonic acid-related gene expression by glutathione. *Plant Cell Environ* 36: 1135–1146
- **Hancock JT** (2012) NO synthase? Generation of nitric oxide in plants. *Period Biol* 114: 19–24
- **Harms K, von Ballmoos P, Brunold C, Hofgen R, Hesse H** (2000) Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. *Plant J* 22: 335–343
- **Hatano-Iwasaki A., Ogawa K** (2012) Overexpression of the GSH1 gene mimics transcriptional response to low temperature during seed vernalization treatment of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 53: 1195–1203
- **Hell R, Bergmann L** (1990) γ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* 180: 603–612
- **Henle ES, Luo Y, Gassman W, Linn S** (1996). Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated Fenton reactions: The deoxyguanosine family. *J Biol Chem* 271: 21177–21186
- **Herbette S, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P** (2002) Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *Eur J Biochem* 269: 2414–2420
- **Hernández L.E, Sobrino-Plata J, Montero-Palmero M.B, Carrasco-Gil S, Flores-Cáceres M.L., Ortega-Villasante C, Escobar C** (2015) Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress. *J Exp Bot* 66: 2901–2911
- **Herschbach C, Rennenberg H** (1994) Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulfate and sulfate transport in tobacco plants. *J Exp Bot* 45: 1069–1076
- **Herschbach C, Rennenberg H** (1995) Long-distance transport of ³⁵S-sulfur in 3-year-old beech trees (*Fagus sylvatica*) *Physiol Plant* 95: 379–386
- **Hicks LM, Cahoon RE, Bonner ER, Rivard RS, Sheffield J, Jez JM** (2007) Thiol-based regulation of redox-active glutamate-cysteine ligase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 2653–2661
- **Hoeberichts FA, Davoine C, Vandorpe M, Morsa S, Ksas B, Stassen C, Triantaphylidès C, Van Breusegem** (2013) Cryptogein-induced transcriptional reprogramming in tobacco is light dependent. *Plant Physiol* 163: 263–275

- **Holzmeister C, Gaupels F, Geerlof A, Sarioglu H, Sattler M, Durner J, Lindermayr C** (2015) Differential inhibition of Arabidopsis superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *J Exp Bot* 66: 989–999
- **Hopkins FG, Morgan EJ** (1936) Some relations between ascorbic acid and glutathione. *Biochem J* 30: 1446–1462
- **Hopkins RJ, van Dam NM, van Loon JJA** (2009) Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annu Rev Entomol* 54: 57–83
- **Hothorn T, Hornik K, and Zeileis A** (2006) Unbiased recursive partitioning: A conditional inference framework. *J Comput Graph Stat* 15: 651– 674
- **Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L** (2008) Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinformatics* 2008: 420747
- **Huang S, Van Aken O, Schwarzlander M, Belt K, Millar AH** (2016) Roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signalling and stress response in plants. *Plant Physiol.* 171: 1551–1559
- **Hurd TR, Costa NJ, Dahm CC, Beer S.M, Brown SE, Filipovska A, and Murphy MP** (2005a) Glutathionylation of mitochondrial proteins. *Antioxid Redox Signal* 7: 999–1010
- **Hurd TR, Filipovska A, Costa NJ, Dahm CC and Murphy, MP** (2005b) Disulphide formation on mitochondrial protein thiols. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 1390–1393.
- **Iqbal A, Yabuta Y, Takeda T, Nakano Y, Shigeoka S** (2006) Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of Arabidopsis thaliana. *FEBS J* 273: 5589–5597
- **Jannat R, Uraji M, Morofuji M, Islam MM, Bloom RE, Nakamura Y, McClung CR, Schroeder JI, Mori IC, Murata Y** (2011) Roles of intracellular hydrogen peroxide accumulation in abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. *J Plant Physiol* 168: 1919–1926
- **Jaspers P, Kangasjärvi J** (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol Plant* 138: 405–413
- **Jez JM, Cahoon RE** (2004) Kinetic mechanism of glutathione synthetase from Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* 279: 42726–42731
- **Jez JM, Cahoon RE, Chen S** (2004) Arabidopsis thaliana glutamate-cysteine ligase: Functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. *J Biol Chem* 279: 33463–33470
- **Jimenez A, Hernandez JA, del Rio LA, Sevilla F** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 114: 275–284
- **Jobe EM, McQuate AL, Zhao X** (2012) Crosstalk among epigenetic pathways regulates neurogenesis. *Front Neurosci* 6: 59
- **Johnston EJ, Rylott EL, Beynon E, Lorenz A, Chechik V, Bruce NC** (2015) Monodehydroascorbate reductase mediates TNT toxicity in plants. *Science* 349: 1072–1075
- **Jones JD, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–329
- **Jubany-Mari T, Alegre-Batlle L, Jiang K, Feldman L.J** (2010) Use of a redox-sensing GFP (c-roGFP1) for real-time monitoring of cytosol redox status in Arabidopsis thaliana water-stressed plants. *FEBS Lett* 584: 889–97

- **Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V** (2014) Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol Cell* 54: 43–55
- **Kaiser WM** (1979) Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* 145: 377–382
- **Kamada-Nobusada T, Hayashi M, Fukazawa M, Sakakibara H, Nishimura M** (2008) A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 49: 1272–1282
- **Kang K, Lee D, Hong S, Park SG, Song MR** (2013) The E3 ligase Mind bomb-1 (Mib1) modulates Delta-Notch signaling to control neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord. *J Biol Chem* 288: 2580–2592
- **Kangasjärvi J, Jaspers P, Kollist H** (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell Environ.* 28: 1021–1036
- **Kangasjarvi J, Talvinen J, Utriainen M, Karjalainen R** (1994) Plant defence system induced by ozone. *Plant Cell* 17: 783–794
- **Kangasjärvi S, Kangasjärvi J** (2014). Towards understanding extracellular ROS sensory and signaling systems in plants. *Adv Bot* 2014: 10
- **Kangasjarvi S, Lepisto A, Hannikainen K, Piippo M, Luomala EM, Aro EM, Rintamaki E** (2008) Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochem J* 412: 275–285
- **Kangasjärvi S, Neukermans J, Li S, Aro E.M, Noctor G** (2012) Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *J Exp Bot* 63: 1619–1636
- **Kärkönen A, Kuchitsu K** (2015) Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* 112: 22–32
- **Kärkönen A, Meisrimler CN, Takahashi J, Väisänen E, Laitinen T, Jiménez Barboza LA, Holmström S, Salonvaara S, Wienkoop S, Fagerstedt KV, Luthje S** (2014) Isolation of cellular membranes from lignin-producing tissues of Norway spruce and analysis of redox enzymes. *Physiol Plant* 152: 599–616
- **Kataya AMR, Reumann S** (2010) *Arabidopsis* glutathione reductase 1 is dually targeted to peroxisomes and the cytosol. *Plant Signal Behav* 5: 171–175
- **Katerji N, Mastrorilli M, Lahmer FZ, Oweis T** (2012) Emergence rate as a potential indicator of crop salt-tolerance. *Eur J Agron* 38: 1–9
- **Kaur J, Srikanth CV, Bachhawat AK** (2009) Differential roles played by the native cysteine residues of the yeast glutathione transporter, Hgt1p. *FEMS Yeast Res* 9: 849–866
- **Kaurilind E, Xu E, Brosché M** (2015) A genetic framework for H₂O₂ induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 16: 837
- **Kaya H, Nakajima R, Iwano M, Kanaoka MM, Kimura S, Takeda S, Kawarazaki T, Senzaki E, Hamamura Y, Higashiyama T, Takayama S, Abe M, Kuchitsu K** (2014) Ca²⁺-activated reactive oxygen species production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell* 26: 1069–1080

- **Kelly GJ, Latzko E** (1979) Soluble ascorbate peroxidase: detection in plants and use in vitamin C estimation. *Naturwissenschaften* 66: 617–619
- **Kerchev P, Mühlenbock P, Denecker J, Morreel K, Hoeberichts FA, Van Der Kelen K, Vandorpe M, Nguyen L, Audenaert D, Van Breusegem F** (2015) Activation of auxin signalling counteracts photorespiratory H₂O₂-dependent cell death. *Plant Cell Environ.* 38: 253–265
- **Kim C, Meskauskiene R, Zhang S, Lee KP, Ashok ML, Blajicka K, Herrfurth C, Feussner I, Apel K** (2012) Chloroplasts of Arabidopsis are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway. *Plant Cell* 24: 3026–3039
- **Kim TH, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI** (2010) Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu Rev Plant Biol* 61: 561–591
- **Kim Y, Tsuda K, Igarashi D, Hillmer RA, Sakakibara H, Myers CL, Katagiri F** (2014) Mechanisms underlying robustness and tunability in a plant immune signaling network. *Cell Host and Microbe* 15: 84–94
- **Kirkland JB** (1991) Lipid peroxidation, protein thiol oxidation and DNA damage in hydrogen peroxide-induced injury to endothelial cells : role of activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Acta* 1092: 319–325
- **Klein M, Burla B, Martinoia E** (2006) The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of AT P-binding cassette transporters in plants. *FEBS Lett* 580: 1112–1122
- **Klepper B** (1991) Root-shoot relationships. *In* Plant Roots-The Hidden Half. Eds. YWaisel, A Eshel and U Kafkafi. pp 265-286
- **Kliebenstein DJ, Monde R, Last RL** (1998) Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol* 118: 637–650
- **Kmiecik P, Leonardelli M, Teige M** (2016) Novel connections in plant organellar signalling link different stress responses and signalling pathways. *J Exp Bot* 67: 3793–3807
- **Kobayashi T, Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK** (2007) The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19150–19155
- **Koffler BE, Maier R, Zechmann B** (2011) Subcellular distribution of glutathione precursors in Arabidopsis thaliana. *J Integr Plant Biol* 53: 930–941
- **Koh S, Wiles AM, Sharp JS, Naider FR, Becker JM, Stacey G** (2002) An oligopeptide transporter gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol* 128: 21–29
- **Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CMJ** (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* 147: 1358–1368
- **Kopczewski T, Kuźniak E** (2013) Redox signals as a language of interorganellar communication in plant cells. *Centr Eur J Biol* 8: 1153–1163
- **Koprivova A, Kopriva S** (2016) Hormonal control of sulfate uptake and assimilation. *Plant Mol Biol* 91: 617–627

- **Kornyeyev D, Logan BA, Allen RD, Holaday AS** (2005) Field-grown cotton plants with elevated activity of chloroplastic glutathione reductase exhibit no significant alteration of diurnal or seasonal patterns of excitation energy partitioning and CO₂ fixation. *Field Crops Res* 94: 165–175
- **Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2940–2945
- **Kozioł MJ, Whatley FR** (2016) Gaseous air pollutants and plant metabolism. Butterworth-Heinemann, Oxford, pp 117–127
- **Kranner I, Birtic S, Anderson KM Pritchard, HW** (2006) Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death. *Free Rad Biol Med* 40: 2155–2165
- **Krieger-Liszkay A** (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* 56: 337–346
- **Krieger-Liszkay A, Fufezan C, Trebst A** (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynth Res* 98: 551–564
- **Krueger S, Niehl A, Martin M, Steinhauser D, Donath A, Hildebrandt T, Romero L, Hoefgen R, Gotor C, Hesse H** (2009) Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 32: 349–367
- **Krupa SV** (2003) Joint effects of elevated levels of ultraviolet-B radiation, carbon dioxide and ozone on plants. *Photochem Photobiol* 78: 535–542
- **Kubo Y, Tsunehiro T, Nishikawa S, Nakai M, Ikeda E, Toh-e A, Morishima N, Shibata T, Endo T** (1999) Two distinct mechanisms operate in the reactivation of heat-denatured proteins by the mitochondrial Hsp70/Mdj1p/Yge1p chaperone system. *J Mol Biol* 286: 447–464
- **Kumar A, Pottiboyina V, Sevilla MD** (2011) Hydroxyl radical (OH•) reaction with guanine in an aqueous environment: a DFT study. *J Phys Chem B* 115: 15129–37
- **Kunihiro A, Yamashino T, Nakamichi N, Niwa Y, Nakanishi H, Mizuno T** (2011) PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 and 5 (PIF4 and PIF5) activate the homeobox ATHB2 and auxin-inducible IAA29 genes in the coincidence mechanism underlying photoperiodic control of plant growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 52: 1315–1329
- **Kushnir S** (2002) Glutamyl transpeptidase in transgenic tobacco plants. Cellular localization, processing, and biochemical properties. *Plant Physiol* 128: 1109–1119
- **Kwak JM, Mori I, Pei Z-M, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom R, Bodde S, Jones JDG, Schroeder JI** (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* 22: 2623–2633
- **Labrou NE, Papageorgiou AC, Pavli O, Flemetakis E** (2015) Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response. *Curr Opin Biotechnol* 32: 186–194
- **Laloi C, Havaux M** (2015) Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants. *Front. Plant Sci.* 6: 39
- **Laloi C, Stachowiak M, Pers-Kamczyc E, Warzych E, Murgia I, Apel K** (2007) Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 672–677
- **Lam E** (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 305–315

- **Le Treut H** (2009) *Nouveau climat sur la Terre : comprendre, prédire, réagir*, Flammarion
- **Le Treut H, Huet S, Chappellaz J, Godard O** (2010) *Changement climatique : les savoirs et les possibles*, Editions la ville brûle
- **Lee JS, Ellis BE** (2007) Arabidopsis MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *J Biol Chem* 282: 25020–25029
- **Lee U, Wie C, Fernandez BO, Feelisch M, Vierling E** (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 786–802
- **Leustek T, Martin MN, Bick J-A, Davies JP** (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 141–165
- **Leymarie J, Vitkauskaitė G, Hoang HH, et al.** (2012) Role of reactive oxygen species in the regulation of Arabidopsis seed dormancy. *Plant Cell Physiol* 53: 96–106
- **Li CR, Liang DD, Li J, Duan YB, Li H, Yang YC, Qin RY, Li L, Wei PC, Yang JB** (2013) Unravelling mitochondrial retrograde regulation in the abiotic stress induction of rice ALTERNATIVE OXIDASE 1 genes. *Plant Cell Environ* 36: 775–788
- **Liang H, Yao N, Song JT, Luo S, Lu H Greenberg JT** (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev* 17: 2636–2641
- **Lindermayr C, Sell S, Müller B, Leister D, Durner J** (2010) Redox regulation of the NPR1–TGA1 system of Arabidopsis thaliana by nitric oxide. *Plant Cell* 22: 2894–2907
- **Linka N, Theodoulou FL** (2013) Metabolite transporters of the plant peroxisomal membrane: known and unknown. *Subcell Biochem* 69: 169–194
- **Lisenbee C, Lingard MJ, Trelease RN** (2005) Arabidopsis peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase. *Plant J* 43: 900–914
- **Liszkay A, Kenk B, Schopfer P** (2003) Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* 217: 658–667
- **Liszkay A, van der Zalm E, Schopfer P** (2004) Production of reactive oxygen intermediates, H₂O₂, and OH by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* 136: 3114–3123
- **Liu Y, Ren D, Pike S, Pallardy S, Gassmann W, Zhang S** (2007) Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J* 51: 941–954
- **Loeffler C, Berger S, Guy A, Durand T, Bringmann G, Dreyer M, von Rad U, Durner J, Mueller MJ** (2005) B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol* 137: 328–340
- **López-Cruz J, Crespo-Salvador Ó, Fernández-Crespo E, García-Agustín P, González-Bosch C** (2016) Absence of Cu–Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces Botrytis cinerea virulence in Arabidopsis and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways. *Mol Plant Pathol* 18: 16–31
- **López-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM, del Río LA** (1999) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochem J* 337: 531–536

- **Lozano-Durán R, Zipfel C** (2015) Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends Plant Sci* 20: 12–19
- **Lu YM, Jia Z, Janus C, Henderson JT, Gerlai R, Wojtowicz JM, Roder JC** (1997) Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci* 17: 5196–5205
- **Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hortensteiner S, Martinoia E, Rea PA** (1998) AtMRP2, and Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant cell* 10: 267–282
- **Lüthje S, Möller B, Perrineau FC, Wöltje K** (2013) Plasma membrane electron pathways and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 18: 2163–2183
- **Lüthje S, Van Gestelen P, Córdoba-Pedregosa MC, Gonzáles-Reyes JA, Asard H, Villalba JM, Böttger M** (1998) Quinones in plant plasma membranes: a missing link? *Protoplasma* 205: 43–51
- **Mallik AU, Wdowiak JV, Cooper EJ** (2011) Growth and reproductive responses of *Cassiope tetragona*, a circumpolar evergreen shrub, to experimentally delayed snowmelt. *Arct Antarct Alp Res* 43: 404–409
- **Mangano, S., Denita Juárez, S., and Estevez, J. M** (2016) ROS regulation of polar-growth in plant cells. *Plant Physiol* 171: 1593–1605
- **Mannervik B** (2012) Five decades with glutathione and the GSTome. *J Biol Chem* 287: 6072–6083
- **Marino D, Peeters N, Rivas S** (2012) Ubiquitination during plant immune signaling. *Plant Physiol* 160: 15–27
- **Martienssen R, Dolan L** (1998) Patterns in vegetative development. In M Anderson, J Roberts, eds, *Arabidopsis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, pp 262–297
- **Martin MN, Saladores PH, Lambert E, Hudson AO, Leustek T** (2007) Localization of members of the gamma-glutamyl transpeptidase family identifies sites of glutathione and glutathione S-conjugate hydrolysis. *Plant Physiol* 144: 1715–1732
- **Martin MN, Slovin JP** (2000) Purified γ -glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiol* 122: 1417–1426
- **Martinoia E, Grill E, Tommasini R, Kreuz K, Amrhein N** (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate ‘export’ pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247–249
- **Marty L, Siala W, Schwarzländer M, Fricker MD, Wirtz M, Sweetlove LJ, Meyer Y, Reichheld JP, Hell R** (2009) The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9109–9114
- **Maughan SC, Pasternak M, Cairns N, Kiddle G, Brach T, Jarvis R, Haas F, Nieuwland J, Lim B, Müller C, Salcedo-Sora E, Kruse C, Orsel M, Hell R, Miller AJ, Bray P, Foyer C.H, Murray JA, Meyer AJ, Cobbett CS** (2010) Plant homologs of the Plasmodium falciparum chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2331–2336
- **Maurino VG, Peterhansel C** (2010) Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. *Curr Opin Plant Biol* 13: 249–256
- **May MJ, Parker JE, Daniels MJ, Leaver CJ, Cobbett CS** (1996) An Arabidopsis mutant depleted in glutathione shows unaltered responses to fungal and bacterial pathogens. *Mol Plant Microb Int* 9: 349–356

- **Mehler AH** (1951) Studies on reactivities of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch Biochem Biophys* 33: 65–77
- **Meijer HJG, Munnik T** (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54: 265–306
- **Meister A** (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263: 17205–17208
- **Mendoza-Cozatl DG, Jobe TO, Hauser F, Schroeder JI** (2011) Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Curr Opin Plant Biol* 14: 554–562
- **Mendoza-Cózatl DG, Zhai Z, Jobe T.O, Akmakjian GZ, Song W-Y, Limbo O, Russell MR, Kozlovskyy VI, Martinoia E, Vatamaniuk OK, Russell P, Schroeder JI** (2010) Tonoplast-localized Abc2 transporter mediates phytochelatin accumulation in vacuoles and confers cadmium tolerance. *J Biol Chem* 285: 40416–40426
- **Meng X, Zhang S** (2013) MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol* 51: 245–266
- **Meskauskiene R, Nater M, Goslings D, Kessler F, op den Camp R, Apel K** (2001) FLU: A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12826–12831
- **Meyer A, Hell R** (2005) Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth Res* 86: 435–457
- **Meyer AJ** (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J Plant Physiol* 165: 1390–1403
- **Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell R** (2007) Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J* 52: 973–986
- **Mhamdi A, Hager J, Chaouch S, Queval G, Han Y, Taconnat L, Saindrenan P, Gouia H, Issakidis-Bourguet E, Renou JP, Noctor G** (2010b) *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE 1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular H₂O₂ and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol* 153: 1144–1160
- **Mhamdi A, Mauve C, Gouia H, Saindrenan P, Hodges M, Noctor G** (2010c) Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Environ* 33: 1112–1123
- **Mhamdi A, Noctor G, Baker A** (2012) Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Arch Biochem Biophys* 525: 181–194
- **Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G** (2010a) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61: 4197–4220
- **Mignolet-Spruyt L, Xu E, Idänheimo N, Hoeberichts FA, Mühlenbock P, Brosché M, Van Breusegem F, Kangasjärvi J** (2016) Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *J Exp Bot* 67(13): 3831–44
- **Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R** (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal* 2: ra45

- **Miller G, Shulaev V, Mittler R** (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plant* 133: 481–489
- **Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, and Mittler R** (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33: 453–467
- **Mittler R, Blumwald E** (2015) The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *Plant Cell* 27: 64–70
- **Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Breusegem FV** (2011) ROS signalling: the new wave? *Trends Plant Sci* 16: 300–309
- **Mittler R, Zilinskas BA** (1991) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *FEBS Lett* 289: 257–259
- **Mittler R, Zilinskas BA** (1992) Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J Biol Chem* 267: 21802–21807
- **Moede W, Barry CS, Tauriainen J, Utriainen M, Grierson D, Sandermann H, Langabartles C, Kangasjarvi J** (2002) Ethylene synthesis regulated by bi-phasic induction of ACC synthase and ACC oxidase genes is required for H₂O₂ accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiol* 130: 1918–1926
- **Møller AP, Mousseau TA, de Lope F, Saino N** (2007) Elevated frequency of abnormalities in barn swallows from Chernobyl. *Biol Lett* 3: 414–417
- **Møller IM, Sweetlove LJ** (2010). ROS signalling - specificity is required. *Trends Plant Sci* 15: 370–374
- **Mor A, Koh E, Weiner L, Rosenwasser S, Sibony-Benyamini H, Fluhr R** (2014) Singlet oxygen signatures are detected independent of light or chloroplasts in response to multiple stresses. *Plant Physiol* 165: 249–261
- **Mubarakshina MM, Ivanov BN** (2010) The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes. *Physiol Plant* 140: 103–110
- **Muhlenbock P, Szechynska-Hebda M, Plaszczyca M, Baudo M, Mullineaux PM, Parker JE, Karpinska B, Karpinski S** (2008) Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 2339–2356
- **Mukherjee S, Paul AK, Stoeckli-Evans H** (2014) *Sens. Actuators B Chem* 202: 1190–1199
- **Müller K, Linkies A, Vreeburg RAM, Fry SC, Krieger-Liszkay A, Leubner-Metzger G** (2009) In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiol* 150: 1855–1865
- **Müller-Moulé P, Conklin PL, Niyogi KK** (2002) Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiol* 128: 970–977
- **Mulliken RS** (1928) The assignment of quantum numbers for electron in, molecules. *I Physical Review* 32: 186–222
- **Mullineaux PM, Rausch T** (2005) Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynth Res* 86: 459–474
- **Mur LAJ, Sivakumaran A, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJM, Hebelstrup KH** (2012). Haemoglobin modulates salicylate and jasmonate/ethylene-mediated resistance mechanisms against pathogens. *J Exp Bot* 63: 4375–4387

- **Murgia I, Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Carravieri S, Soave C** (2004) *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J* 38: 940–953
- **Murphy E, Smith S, De Smet I** (2012) Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: how cells communicate over a short distance. *Plant Cell* 24: 3198–3217
- **Myouga F, Hosoda C, Umezawa T, Iizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, Shinozaki K** (2008) A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 3148–3162
- **Narendra S, Venkataramani S, Shen G, Wang J, Pasapula V, Lin Y, Korniyev D, Holaday AS, Zhang H** (2006) The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development. *J Exp Bot* 57: 3033–3042
- **Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP, Rouhier N** (2006) Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology* 142: 1364–1379
- **Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP** (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant* 129: 185–195
- **Née G, Zaffagnini M, Trost P, Issakidis-Bourguet E** (2009) Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin. *FEBS Lett* 583: 2827–2832
- **Neill S, Desikan R, Hancock J** (2002) Hydrogen peroxide signalling *Curr Opin. Plant Biol* 5: 388–398
- **Neuefeind T, Huber R, Dasenbrock H, Prade L, Bieseler B** (1997) Crystal-structure of herbicide-detoxifying maize glutathione *S*-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. *J Mol Biol* 274: 446–453
- **Ng S, Giraud E, Duncan O, Law SR, Wang Y, Xu L, Narsai R, Carrie C, Walker H, Day DA, Blanco NE, Strand Å, Whelan J, Ivanova A** (2013). Cyclin-dependent kinase E1 (CDKE1) provides a cellular switch in plants between growth and stress responses. *J Biol Chem* 288: 3449–3459
- **Nishimura H, Hayamizu T, Yanagisawa Y** (1986) Reduction of nitrogen oxide (NO₂) to nitrogen oxide (NO) by rush and other plants. *Environ Sci Technol* 20: 413–416
- **Nishimura, MT and JL Dangel** (2010) *Arabidopsis* and the Plant Immune System. *Plant J.* 61: 1053–1066
- **Nishizawa M, Tanigawa M, Hayashi M, Maeda T, Yazaki Y, Saeki Y, and Toh A** (2010) Pho85 kinase, a cyclin-dependent kinase, regulates nuclear accumulation of the Rim101 transcription factor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 9: 943–951
- **Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Foyer CH** (1998) Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiol* 118: 471–482
- **Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH** (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot* 49: 623–647

- **Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Valadier MH, Roux Y, Foyer CH** (1997) The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplars. Possible implications for glutathione production during stress. *Physiol Plant* 100: 255–263
- **Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249–279
- **Noctor G, Foyer CH** (2016) Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiol* 171: 1581–1592
- **Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH** (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 53: 1283–1304
- **Noctor G, Lelarge-Trouverie C, Mhamdi A** (2015) The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry* 112: 33–53
- **Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH** (2016) Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant Cell Environ* 39: 1140–1160
- **Noctor G, Mhamdi A, Queval G, Foyer CH** (2013) Regulating the redox gatekeeper: vacuolar sequestration puts glutathione disulfide in its place. *Plant Physiol* 163: 665–671
- **Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch S, Foyer CH** (2011) Glutathione . *The Arabidopsis Book* 9: 1–32
- **Noctor G, Reichheld JP, Foyer CH** (2017) ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin Cell Dev Biol* . In press.
- **Noguchi K, Yoshida K** (2008) Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. *Mitochondrion* 8: 87–99
- **Noji M, Saito K** (2002) Molecular and biochemical analysis of serine acetyltransferase and cysteine synthase towards sulphur metabolic engineering in plants. *Amino Acids* 22: 231–243
- **Nomura H, Komori T, Uemura S, Kanda Y, Shimotani K, Nakai K, Furuichi T, Takebayashi K, Sugimoto T, Sano S, Suwastika IN, Fukusaki E, Yoshioka H, Nakahira Y, Shiina T** (2012) Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in Arabidopsis. *Nat Commun* 3: 926
- **Nyathi Y, Baker A** (2006) Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1478–1495
- **O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP** (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236: 765–779
- **O'Brien JA, Daudi A, Finch P, Butt VS, Whitelegge JP, Souda P, Ausubel FM, Bolwell GP** (2012) A Peroxidase-Dependent Apoplastic Oxidative Burst in Cultured Arabidopsis Cells Functions in MAMP-Elicited Defense. *Plant Physiol* 158: 2013–2027
- **Obara K, Sumi K, and Fukuda H** (2002) The use of multiple transcription starts causes the dual targeting of Arabidopsis putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 43: 697–705
- **Ochsenbein C, Przybyla D, Danon A, Landgraf F, Gobel C, Imboden A, Feussner I, Apel K** (2006) The role of EDS1 (enhanced disease susceptibility) during singlet oxygen-mediated stress responses of Arabidopsis. *Plant J* 47: 445–456

- **Ogawa K, Hatano-Iwasaki A, Yanagida M and Iwabuchi M** (2004) Level of glutathione is regulated by ATP-dependent ligation of glutamate and cysteine through photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: Mechanism of strong interaction of light intensity with flowering. *Plant Cell Physiol* 45: 1–8
- **Ohkama-Ohtsu N, Oikawa A, Zhao P, Xiang C, Saito K, Oliver DJ** (2008) A γ -Glutamyl Transpeptidase-Independent Pathway of Glutathione Catabolism to Glutamate via 5-Oxoproline in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148: 1603–1613
- **Ohkama-Ohtsu N, Radwan S, Peterson A, Zhao P, Badr AF, Xiang C, Oliver DJ** (2007a) Characterization of the extracellular γ -glutamyl transpeptidases GGT1 and GGT2 in *Arabidopsis*. *Plant J* 49: 865–877
- **Ohkama-Ohtsu N, Zhao P, Xiang C, Oliver DJ** (2007b) Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by γ -glutamyl transpeptidase GGT3 in *Arabidopsis*. *Plant J* 49: 878–888
- **Oidaira H, Sano S, Koshiba T, Ushimaru T** (2000) Enhancement of antioxidative enzyme activities in chilled rice seedlings. *J Plant Physiol* 156: 811–813
- **op den Camp RGL, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg E, Göbel C, Feussner I, et al** (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2320–2332
- **Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Farrant J.M, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, and Bailly C** (2007) ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J* 50: 452–465
- **Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F, and Bailly C** (2009) The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol* 150: 494–505
- **Orlowski M, Meister A** (1973) γ -Glutamyl cyclotransferase distribution, isozymic forms, and specificity. *J Biol Chem* 248: 2836–2844
- **Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L.-S. P** (2013) Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J Exp Bot* 64: 445–458
- **Osmond CB, Grace SC** (1995) Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *J Exp Bot* 46: 1351–1362
- **Ono Y, Kim DW, Watanabe K, Sasaki A, Niitsu M, Berberich T, Kusano T, Takahashi Y** (2012) Constitutively and highly expressed *Oryza sativa* polyamine oxidases localize in peroxisomes and catalyze polyamine back conversion. *Amino Acids* 42: 867–876
- **Overmyer K, Brosché M, Pellinen R, Kuittinen T, Tuominen H, Ahlfors R, Keinänen M, Saarma M, Scheel D, Kangasjärvi J** (2005) Ozone-induced programmed cell death in the *Arabidopsis* radical-induced cell death1 mutant. *Plant Physiol* 137: 1092–1104
- **Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann HJ, Kangasjärvi J** (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis* *red1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12: 1849–1862
- **Padmanabhan M and Dinesh-Kumar SP** (2010) All Hands on Deck - the Role of Chloroplasts, ER and Nucleus in Driving Plant Innate Immunity. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 1368–1380

- **Page SE, Hooijer A** (2016) In the line of fire: the peatlands of Southeast Asia. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371. pii: 20150176
- **Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Río LA** (2002) Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol Biochem* 40: 521–530
- **Palmieri MC, Lindermayr C, Bauwe H, Steinhauser C, Durner J** (2010) Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation. *Plant Physiol* 152: 1514–1528
- **Pang H, Tan Z, Qin G, Wang Y, Li Z, Jin Q, Cai Y** (2012) Phenotypic and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from forage crops and grasses in the Tibetan Plateau. *J Microbiol* 50: 63–71
- **Parisy V, Poinssot B, Owsianowski L, Buchala A, Glazebrook J, Mauch F** (2007) Identification of PAD2 as a γ -glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant J* 49: 159–172
- **Park J, Song WY, Ko D, Eom Y, Hansen TH, Schiller M, Lee Y** (2012) The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *The Plant Journal* 69: 278–288
- **Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C** (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife, *Plant Cell Reports* 24: 255–265
- **Passardi F, Penel C, Dunand C** (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9: 534–540
- **Pasternak M, Lim B, Wirtz M, Hell R, Cobbett CS, Meyer AJ** (2008) Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *Plant J* 53: 999–1012
- **Pennell R.I. and Lamb C** (1997) Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell* 9: 1157–1168
- **Pesaresi P, Schneider A, Kleine T, Leister D** (2007) Interorganellar communication. *Curr Opin Plant Biol* 10: 600–606
- **Peuke AD, Rennenberg H** (2005) Phytoremediation with transgenic trees. *Z Naturforsch C* 60: 199–207
- **Pieterse CM, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, and Van Wees SC** (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 489–521
- **Pike S, Patel A, Stacey G, Gassmann W** (2009) *Arabidopsis* OPT6 is an Oligopeptide Transporter with Exceptionally Broad Substrate Specificity. *Plant Cell Physiol* 50: 1923–1932
- **Planas-Portell J, Gallart M, Tiburcio AF, Altabella T** (2013) Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 13:109
- **Planchet E, Gupta KJ, Sonoda M, Kaiser WM** (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* 41: 732–743
- **Planck M** (1901) Ueber das Gesetz der Energieverteilung im Normals pectrum. *Ann Phys* 309 : 553–563
- **Polle A** (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol* 126: 445–462
- **Pospíšil P** (2012) Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 218–231

- **Potters G, Pasternak T, Guisez Y, Palme K, Jansen M (2007)** Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Sci* 12: 98–105
- **Queval G, Hager J, Gakière B, Noctor G (2008)** Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in quantitative assays of leaf extracts. *J Exp Bot* 59: 135–146
- **Queval G, Issakidis-Bourguet E, Hoerberichts FA, Vandoorpe M, Gakière B, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Van Breusegem F, Noctor G (2007)** Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *Plant J* 52: 640–657
- **Queval G, Jaillard D, Zechmann B, Noctor G (2011)** Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ* 34: 21–32
- **Queval G, Neukermans J, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2012)** Day length is a key regulator of transcriptomic responses to both CO₂ and H₂O₂ in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 35: 374–387
- **Queval G, Thominet D, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Gakière B, Noctor G (2009)** H₂O₂-activated up-regulation of glutathione in Arabidopsis involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Molecular Plant* 2: 344–356
- **Rabesiranana N, Rasolonirina M, Solonjara AF, Ravoson HN, Andriambololona R, Mabit L (2016)** Assessment of soil redistribution rates by ¹³⁷Cs and ²¹⁰Pb_{ex} in a typical Malagasy agricultural field. *J Environ Radioact* 152: 112–118
- **Rahantaniaina MS, Li S, Chatel-Innocenti G, Tuzet A, ElIssakidis-Bourguet E, Mhamdi A, Noctor G (2017b)** Cytosolic and chloroplastic DHARs cooperate in oxidative stress-driven activation of the salicylic acid pathway. *Plant Physiol* 174: 956–971
- **Rahantaniaina MS, Li S, Chatel-Innocenti G, Tuzet A, Mhamdi A, Vanacker H, Noctor G (2017a)** Glutathione oxidation in response to intracellular H₂O₂: key but overlapping roles for dehydroascorbate reductases. *Plant Signal Behav* 12, e1356531
- **Rahantaniaina MS, Tuzet A, Mhamdi A, Noctor G (2013)** Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants? *Front Plant Sci* 4: 477
- **Ramel D, Wang X, Laflamme C, Montell DJ, Emery G (2013)** Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements. *Nat Cell Biol* 15: 317
- **Ramsay DA, Hinze J (1975)** Selected papers of Mulliken RS. Chicago : University of Chicago Press. Ransil BJ 1960. Studies in molecular. I Scope and summary of the diatomic molecule program. *Reviews of Modern Physics* 32 : 239–244
- **Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP (1996)** UV-B- and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* 110: 125–136
- **Rao MV, Lee HI, Creelman RA, Mullet JE, Davis KR (2000)** Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* 12: 1633–1646
- **Raven EL, Lad L, Sharp KH, Mewies M, Moody PC (2004)** Defining substrate specificity and catalytic mechanism in ascorbate peroxidase. *Biochem Soc Symp* 2004: 27–38
- **Rea PA (1999)** MRP subfamily transporters from plants and yeast. *J Exp Bot* 50: 895–913

- **Rea PA** (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* 58: 347–375
- **Redinbaugh MG, Sabre M, Scandalios JG** (1990) The distribution of catalase activity, isozyme protein, and transcript in the tissues of the developing maize seedling. *Plant Physiol* 92: 375–380
- **Reichheld JP, Khafif M, Riondet C, Bonnard G, Meyer Y** (2007) Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in Arabidopsis development. *Plant Cell* 19: 1851–1865
- **Rennenberg H** (1982) Glutathione Metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* 21: 2771–2781
- **Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermeil S, Inzé D, Mittler R** (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J* 32: 329–342
- **Robinson JM** (1988) Does O₂ photoreduction occur within chloroplasts in vivo? *Plant Physiol* 72: 666–680
- **Rochon A, Boyle P, Wignes T, Fobert PR, Despres C** (2006) The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* 18: 3670–3685
- **Roden and Ingle, 2009 LC** (2009) Roden, R.A. Ingle *Plant Cell* 21: 2546-2552
- **Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Sanz-Fernández M, Hu J, Sandalio LM** (2016) Peroxisomes extend peroxules in a fast response to stress via a reactive oxygen species-mediated induction of the peroxin PEX11a. *Plant Physiol* 171: 1665–1674
- **Rohatgi-Mukherjee KK** (1978) *Fundamental of Photochemistry* (A Halsted Press book). New York: Wiley
- **Rouhier N, Jacquot JP** (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radic Biol Med* 38 : 1413–1421
- **Sandalio LM, Fernández VM, Rupérez FL, del Río LA** (1988) Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiology* 87: 1–4
- **Sandalio LM, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, del Río LA** (2013) Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. *Sub-cellular Biochem* 69: 231–255
- **Sandalio LM, Romero-Puertas MC** (2015) Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Ann Bot (Lond)* 116: 475–485
- **Sano S Aoyama M Nakai K Shimotani K Yamasaki K Sato MH Tojo D Suwastika IN Nomura H Shiina T** (2014) Light-dependent expression of flg22-induced defense genes in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 5: 531
- **Scandalios JG** (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995–1014
- **Schieber M and Chandel NS** (2014) ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* 24: R453-R462
- **Schippers JHM, Foyer CH, van Dongen JT** (2016) Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Curr Opin Plant Biol* 29: 121–128

- **Schlaeppe, K, Bodenhausen, N, Buchala, A, Mauch, F, Reymond, P** (2008) The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Plant J* 55: 774–786
- **Schmidt M, Dehne S, Feierabend J** (2002) Post-transcriptional mechanisms control catalase synthesis during its light-induced turnover in rye leaves through the availability of the heme cofactor and reversible changes of the translation efficiency of mRNA. *Plant J* 31:601–613
- **Schopfer P, Heyno E, Drepper F, Krieger-Liszka A** (2008) Naphthoquinone-dependent generation of superoxide radicals by quinone reductase isolated from the plasma membrane of soybean. *Plant Physiol* 147: 1–15
- **Schutzendubel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold D L, Polle A** (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol* 127: 887–898
- **Schwarzländer M, Fricker M, Müller C, Marty L, Brach T, Novak T** (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J Microsc* 231: 299–316
- **Sen Gupta A, Alscher RG, Cune D** (1991) Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiol* 96: 650–655
- **Setterdahl AT, Chivers PT, Hirasawa M, Lemaire SD, Keryer E, Miginiac-Maslow M, Kim SK, Mason J, Jacquot JP, Longbine CC, de Lamotte-Guery F, Knaff DB** (2003) Effect of pH on the oxidation–reduction properties of thioredoxins. *Biochemistry* 42: 14877–14884
- **Sewelam N, Jaspert N, Van Der Kelen K, Tognetti VB, Schmitz J, Frerigmann H, Stahl E, Zeier J, Van Breusegem F, Maurino VG** (2014) Spatial H₂O₂ signaling specificity: H₂O₂ from chloroplasts and peroxisomes modulates the plant transcriptome differentially. *Mol Plant* 7: 1191–1210
- **Shah J, Kachroo P, Nandi A, Klessig DF** (2001) A recessive mutation in the *Arabidopsis* *SSI2* gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *Plant J* 25: 563–574
- **Shan C, Liang Z** (2010) Jasmonic acid regulates ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress. *Plant Sci* 178: 130–139
- **Shanmugam V, Tsednee M, Yeh KC** (2012) ZINC TOLERANCE INDUCED BY IRON 1 reveals the importance of glutathione in the cross-homeostasis between zinc and iron in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 69: 1006–1017
- **Shapiguzov A, Vainonen JP, Wrzaczek M, Kangasjärvi J** (2012) ROS-talk – how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Front Plant Sci* 3: 292
- **Sharma OP, Bambawale O M, Gopali JB, Bhagat S, Yelshetty S, Singh SK, Anand R, Singh OM** (2011) Field guide Mung bean and Urd bean. Government of India, Department of agricultural and co-operation, NCIPM, ICAR, New Delhi, India
- **Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53: 1305–1319
- **Sierla M, Rahikainen M, Salojärvi J, Kangasjärvi J, Kangasjärvi S** (2013) Apoplastic and chloroplastic redox signaling networks in plant stress responses. *Antioxid Redox Signal* 18: 2220–2239

- **Silva-Neta I. C, Pinho E, Veiga A, Pinho R., Guimaraes M, Caixeta F** (2015) Expression of genes related to tolerance to low temperature for maize seed germination. *Genet Mol Res* 14: 2674–2690
- **Šimková K, Kim C, Gacek K, Baruah A, Laloi C, Apel K** (2012) The chloroplast division mutant *caa33* of *Arabidopsis thaliana* reveals the crucial impact of chloroplast homeostasis on stress acclimation and retrograde plastid-to-nucleus signaling. *Plant J* 69: 701–712
- **Singh S, Nag S.K, Kundu SS, Maity SB**, (2010) Relative intake, eating pattern, nutrient digestibility, nitrogen metabolism, fermentation pattern and growth performance of lambs fed organically and inorganically produced cowpea hay-barley grain diets. *Trop Grassl* 44: 55-61
- **Singh, KL, Chaudhuri A, and Kar RK** (2015) Role of peroxidase activity and Ca^{2+} in axis growth during seed germination. *Planta* 242: 997–1007
- **Sinha R, Lacadie C, Skudlarski P, Fulbright RK, Rounsaville BJ, Kosten TR, Wexler BE** (2005) Neural activity associated with stress-induced cocaine craving: a functional magnetic resonance imaging study. *Psychopharmacology* 183: 171–180.
- **Smirnoff N** (2011) Vitamin C: the metabolism and functions of ascorbic acid in plants. *Adv Bot Res* 59: 107–177
- **Smirnoff N, Cumbes QJ** (1989) Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes. *Phytochemistry*, 28: 1057-1060
- **Smith IK, Kendall AC, Keys AJ, Turner JC, Lea PJ** (1984) Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Sci Lett* 37: 29–33
- **Soares NC, Francisco R, Vielba JM, Ricardo CP, Jackson PA** (2009) Associating wound-related changes in the apoplast proteome of *Medicago* with early steps in the ROS signal-transduction pathway. *J Prot Res* 8: 2298–2309
- **Sofa A, Scopa A, Nuzzaci M, Vitti A** (2015) Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *Intl. J. Mol. Sci.* 16: 13561–13578
- **Song WY, Yamaki T, Yamaji N, Ko D, Jung KH, Fujii-Kashino M, An G, Martinoia E, Lee Y, Ma JF** (2014) A rice ABC transporter, OsABCC1, reduces arsenic accumulation in the grain. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 15699–15704
- **Sorkheh K, Shiran B, Khodambashi M, Rouhi V, Mosavei S, Sofa A** (2012) Exogenous proline alleviates the effects of H_2O_2 -induced oxidative stress in wild almond species. *Russ. J. Plant Physiol* 59: 788–798
- **Stadtman ER, Moskovitz J, Berlett BS, Levine RL** (2002) Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mol Cell Biochem* 234/235: 3–9
- **Stael S, Kmiciek P, Willems P, Van Der Kelen K, Coll NS, Teige M** (2015) Plant innate immunity—sunny side up? *Trends Plant Sci* 20: 3–11
- **Steinkamp R, Rennenberg H** (1985) Degradation of glutathione in plant cells: evidence against the participation of a γ -glutamyltranspeptidase *Z. Naturforsch C* 40: 29–33
- **Steinkamp R, Schweihofen B, Rennenberg H** (1987) γ -Glutamylcyclotransferase in tobacco suspension cultures: catalytic properties and subcellular localization. *Physiol Plant* 69: 499–503

- **Stevens R, Page D, Gouble B, Garchery C, Zamir D, Causse M** (2008) Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant Cell Environ* 31: 1086–1096
- **Storozhenko S, Belles-Boix E, Babiychuk E, Hérouart D, Davey MR, Slooten L, Van Montagu M, Inzé D, Sugimoto-Shirasu K, Roberts K** (2003) “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* 6: 544–553
- **Straus MR, Rietz S, van Themaat EVL, Bartsch M, Parker JE** (2010) Salicylic acid antagonism of EDS1-driven cell death is important for immune and oxidative stress responses in Arabidopsis. *Plant J* 62: 628–640
- **Streb P. & Feierabend J** (1996) Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rye leaves. *Botanica Acta* 109: 125–132
- **Sung DY, Kim TH, Komives EA, Mendoza-Cózatl DG, Schroeder JI** (2009) ARS5 is a component of the 26S proteasome complex, and negatively regulates thiol biosynthesis and arsenic tolerance in Arabidopsis. *Plant J* 59: 802–813
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ* 35: 259–270
- **Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R** (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr Opin Plant Biol* 14: 691–699
- **Suzuki N, Miller G, Salazar C, Mondal HA, Shulaev E, Cortes DF, Shuman JL, Luo X, Shah J, Schlauch K, Shulaev V, Mittler R** (2013) Temporal–spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. *The Plant Cell* 25: 3553–3569
- **Szabados L, Savouré A** (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15: 89–97
- **Szent-Györgyi A** (1931) On the function of hexuronic acid in the respiration of the cabbage leaf. *J Biol Chem* 90: 385–393
- **Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X** (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952–956
- **Takabe K, Takeuchi M, Sato T, Ito M, Fujita M** (2001) Immunocytochemical localization of enzymes involved in lignification of the cell wall. *J Plant Res* 114: 509–515
- **Tattini M, Gravano E, Pinelli P, Mulinacci N, Romani A** (2000) Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* 148: 69–77
- **Teotia S, Muthuswamy S, Lamb RS** (2010) RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 and SIMILAR TO RCD ONE1 and the stress-induced morphogenetic response. *PSB* 5: 143–145
- **Tewari RK, Prommer J, Watanabe M** (2013) Endogenous nitric oxide generation in protoplast chloroplasts. *Plant Cell Rep* 32: 31–44
- **Tikkanen M., Mekala N. R., Aro E. M** (2014). Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1837: 210–215
- **Tognetti V.B, Van Aken O, Morreel K, Vandenbroucke K, van de Cotte B, De Clercq I, Chiwocha S, Fenske R, Prinsen E, Boerjan W** (2010) Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-

glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance *Plant Cell*, 22: 2660–2679

- **Tommasini R, Martinoia E, Grill E, Dietz K-J, Amrhein N** (1993) Transport of oxidized glutathione into barley vacuoles: evidence for the involvement of the glutathione-S-conjugate ATPase. *Z Naturforsch* 48c: 867–871
- **Torres MA** (2010) ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* 138, 414–429
- **Torres MA, Dangl JL** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* 8: 397–403
- **Triantaphylidès C, Havaux M** (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci* 14: 219–228
- **Triantaphylidès C, Krischke M, Hoeberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller MJ** (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photo-oxidative damage to plants. *Plant Physiol* 148: 960–968
- **Tripathi BN, Bhatt I, Dietz KJ** (2009) Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma* 235 : 3–15
- **Tripathy BC, Oelmüller R** (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal Behav* 7: 1621–1633
- **Tsakagoshi H** (2016). Control of root growth and development by reactive oxygen species. *Curr Opin Plant Biol* 29: 57–63
- **Tuominen H, Overmyer K, Keinänen M, Kollist H, Kangasjärvi J** (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in Arabidopsis. *Plant J* 39: 59–69
- **Turrens JF** (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335–344
- **Tzafrir I, Pena-Muralla R, Dickerman A, Berg M, Rogers R, Hutchens S, Sweeney TC, McElver J, Aux G, Patton D, Meinke D** (2004). Identification of genes required for embryo development in Arabidopsis. *Plant Physiol* 135: 1206–1220
- **Vaahtera L., Brosché M., Wrzaczek M., Kangasjärvi J** (2014). Specificity in ROS signaling and transcript signatures. *Antioxid Redox Signal* 21: 1422–1441
- **Vadassery J, Tripathi S, Prasad R, Varma A, Oelmüller R** (2009) Monodehydroascorbate reductase 2 and dehydroascorbate reductase 5 are crucial for a mutualistic interaction between *Piriformospora indica* and Arabidopsis. *J Plant Physiol* 1668: 1263–1274
- **Vahisalu T, Puzõrjova I, Brosché M, Valk E, Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang YS, Lindgren O, Salojärvi J** (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* 62: 442–453
- **Vainonen, JP. & Kangasjärvi, J** (2015) Plant signalling in acute ozone exposure In : *Plant Cell Environ* 38: 240-252
- **Valero E, González-Sánchez MI, Macià H, García-Carmona F** (2009) Computer simulation of the dynamic behavior of the glutathione-ascorbate redox cycle in chloroplasts. *Plant Physiol* 149: 1958–1969
- **Valero E, Macià H, Fuente I, Hernandez JA, Gonzales-Sanchez MI, Garcia-Carmona F** (2016) Modeling the ascorbate-glutathione cycle in chloroplasts under light/dark conditions. *BMC Systems Biol* 10: 11

- **Van Aken O, Zhang B, Carrie C, Uggalla V, Paynter E, Giraud E, Whelan J** (2009) Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 2: 1310–1324
- **Van Breusegem F, Dat JF** (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* 141: 384–390
- **Van Doorn WG** (2011) Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J Exp Bot* 62: 4749–4761
- **Vanacker H, Carver TL, Foyer CH** (2000) Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol* 123: 1289–1300
- **Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Langebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F** (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 39: 45–58
- **Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, van de Cotte B, Morsa S, Ravanat JL, Hegie A, Triantaphylidès C, Shulaev V, Van Montagu MC, Van Breusegem F, Mittler R** (2011) Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1711–1716
- **Vanderauwera S, Vandenbroucke K, Inzé A, van de Cotte B, Mühlenbock P, De Rycke R** (2012) AtWRKY15 perturbation abolishes the mitochondrial stress response that steers osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 20113–20118
- **Vanderauwera S, Zimmermann P, Rombauts S, Vandenabeele S, Langebartels C, Gruissem W, Inze D, Van Breusegem F** (2005) Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol* 139: 806–821
- **Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A** (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ Sci Pollut Res Int* 16: 765–794
- **Vanlerberghe GC** (2013) Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int J Mol Sci* 14: 6805–6847
- **Vavasseur A, Raghavendra AS** (2005) Guard cell metabolism and CO₂ sensing. *New Phytol* 165: 665–682
- **Verhoeven AS, Demmig-Adams B, Adams WW** (1997) Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. *Plant Physiol* 113: 817–824
- **Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inze D, May MJ, Sung ZR** (2000) The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* 12: 97–110
- **Volt AC, Dempsey DA, Klessing DF** (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47: 177–206
- **Voss RS, Hubbard C, Jansa SA** (2013) Phylogenetic relationships of New World porcupines (Rodentia, Erethizontidae): Implications for taxonomy, morphological evolution, and biogeography. *American Museum Novitates* New York NY 3769: 1–36

- **Wachter A, Wolf S, Steininger H, Bogs J, Rausch T** (2005) Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J* 41: 15–30
- **Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F** (2002) Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol Biol* 49: 515–532
- **Wang Y, Yun BW, Kwon EJ, Hong JK, Yoon JY, Loake GJ** (2006) S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *J Exp Bot* 57: 1777–1784
- **Wanke D, Üner Kolukisaoglu H** (2010) An update on the ABCC transporter family in plants: many genes, many proteins, but how many functions? *Plant Biol* 12: 15–25
- **Wendehenne D, Gao Q. M, Kachroo A, Kachroo P** (2014). Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Curr Opin Plant Bio.* 20C: 127–134
- **Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J** (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* 6: 177–183
- **Wi SJ, Ji NR, Park KY** (2012) Synergistic biosynthesis of biphasic ethylene and reactive oxygen species in response to hemibiotrophic *Phytophthora parasitica* in tobacco plants. *Plant Physiol* 159: 251–265
- **Wigner EP** (1932) "On the quantum correction for thermodynamic equilibrium". *Phys Rev* 40: 749–759
- **Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W** (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C3 plants. *EMBO J* 16: 4806–4816
- **Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J* 16 : 4806–4816
- **Willekens H, Inzé, D Van Montagu M, Van Camp W** (1995) Catalases in plants. *Mol Breed* 1: 207–228
- **Williams B, Dickman M** (2008) Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it. *Mol Plant Pathol* 9: 531–544
- **Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T** (2000) R.A AeschbacherTrehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, ApL3, and starch synthesis in Arabidopsis *Plant Physiol*, 124: 105-114
- **Wojtaszek P** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322: 681–692
- **Wolf AE, Dietz KJ, Schroder P** (1996) Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Lett* 384: 31–34
- **Wrzaczek M, Brosché M, Kangasjärvi J** (2013) ROS signaling loops — production, perception, regulation. *Curr Opin Plant Biol* 16: 575–582
- **Wrzaczek M., Brosché M., Kollist H, Kangasjärvi J** (2009) Arabidopsis GRI is involved in the regulation of cell death induced by extracellular ROS. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 5412–5417
- **Xiang C, Oliver DJ** (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 1539–1550
- **Xu J, Tian YS, Xing XJ, Peng RH, Zhu B, Gao J.J, Yao QH** (2015) Over-expression of AtGSTU19 provides tolerance to salt, drought and methyl viologen stresses in Arabidopsis. *Physiol Plant* 14: 12347

- **Yabuta Y, Motoki T, Yoshimura K, Takeda T, Ishikawa T, Shigeoka S** (2002) Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *Plant J* 32: 915–925
- **Yamasaki H, Sakiham Y** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* 468: 89–92
- **Yao N, Greenberg JT. Arabidopsis** (2006) ACCELERATED CELL DEATH modulates programmed cell death. *Plant Cell* 18: 397–411
- **Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S** (2000) Expression of ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol* 123: 223–233
- **Yu Q, Powles SB** (2014) Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Manag Sci* 70: 1340–1350
- **Zaffagnini M, Bedhomme M, Groni H, Marchand C. H, Puppo C, Gontero B** (2012b) Glutathionylation in the photosynthetic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic survey. *Mol. Cell. Proteomics* 11: M111
- **Zaffagnini M, Bedhomme M, Marchand C. H, Morisse S, Trost P, Lemaire S. D** (2012a) Redox regulation in photosynthetic organisms: focus on glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* 16: 567–586
- **Zago E, Morsa S, Dat JF, Alard P, Ferrarini A, Inzé D, Delledonne M, Van Breusegem F** (2006) Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol* 141: 404–411
- **Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C** (2008) Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Sign* 10: 1527–1547
- **Zechmann B** (1996) Compartment-specific importance of glutathione during abiotic and biotic stress. *Front Plant Sci* 2014: 5:566
- **Zechmann B, Zellnig G, Urbanek-Krajnc A, Müller M** (2007) Artificial elevation of glutathione affects symptom development in ZYMV-infected *Cucurbita pepo* L plants. *Arch Virol* 152: 747–762
- **Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, Wang L, Welti R, Zhang W, Wang X** (2009) Phospholipase Da1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 2357–2377
- **Zhong HH, McClung CR** (1996) The circadian clock gates expression of two *Arabidopsis* catalase genes to distinct and opposite circadian phases. *Mol Gen Genet* 251: 196–203
- **Zhong HH, Young JC, Pease EA, Hangarter RP, McClung CR** (1994) Interactions between light and the circadian clock in the regulation of CAT2 expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 104: 889–898
- **Zimmermann P, Heinlein C, Orendi G, Zentgraf U** (2006) Senescence-specific regulation of catalase in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell Environ* 29: 1049–1056
- **Zurbriggen MD, Carrillo N, Tognetti VB, Melzer M, Peisker M, Hause B, Hajirezaei MR** (2009) Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *The Plant J* 60: 962–973

Partie VII. Annexes

VII.1. Lignées et conditions de culture

Tableau 6 : Liste des lignées d'insertion utilisées

	Lignée mutante	Numéro d'accèsion	Origine
Simple mutant	<i>cat2</i>	At4g35090	SALK_057998 ; Queval et al., 2007
	<i>dhar1</i>	At1g19570	SALK_005238
	<i>dhar2</i>	At1g75270	SALK_026089
	<i>dhar3</i>	At5g16710	SAIL_435_A09
	<i>gstu8</i>	At3g09270	SALK_150234
	<i>gstu24</i>	At1g17170	Salk_034472
	<i>gstf8</i>	At2g47730	SALK_039887
	<i>prxIIe</i>	At3g52960	GABI_829G10
	<i>prxII f</i>	At3g06050	GABI_114G01
Double mutant	<i>cat2 dhar1</i>		Obtenu par croisement
	<i>cat2 dhar2</i>		Obtenu par croisement
	<i>cat2 dhar3</i>		Obtenu par croisement
	<i>dhar1 dhar2</i>		Obtenu par croisement
	<i>dhar1 dhar3</i>		Obtenu par croisement
	<i>dhar2 dhar3</i>		Obtenu par croisement
	<i>cat2 gstu8</i>		Obtenu par croisement
	<i>cat2 gstu24</i>		Obtenu par croisement
	<i>cat2 gstf8</i>		Obtenu par croisement
	<i>gstu8 gstu24</i>		Obtenu par croisement
	<i>gstu8 gstf8</i>		Obtenu par croisement
	<i>gstf8 gstu24</i>		Obtenu par croisement
	<i>cat2 prxIIe</i>		Obtenu par croisement
	<i>cat2 prxII f</i>		Obtenu par croisement
	<i>prxIIe prxII f</i>		Obtenu par croisement
Triple mutant	<i>dhar1 dhar2 dhar3</i>		Obtenu par croisement
	<i>cat2 dhar1 dhar2</i>		Obtenu par croisement
	<i>cat2 dhar1 dhar3</i>		Obtenu par croisement
	<i>cat2 dhar2 dhar3</i>		Obtenu par croisement
Quadruple mutant	<i>cat2 dhar1 dhar2 dhar3</i>		Obtenu par croisement

Tableau 7 : Conditions de culture des plantes

	Photopériode (H)	Intensité lumineuse ($\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Température (°C) jour / nuit	Hygrométrie (%)
Chambre de culture	16	100 à 200	20 / 18	65
Serre	16	Très variable	20 / 18	70
Chambre de culture <i>in vitro</i>	16	100 à 200	20 / 18	65

Tableau 8 : Conditions atmosphériques utilisées pendant la thèse

	CO ₂ (ppm)	O ₃ (ppb)
Conditions optimales	400	0
Fort CO ₂	3000	0
Fumigation à l'O ₃	400	350

Tableau 9 : Marqueurs de sélection pour les vecteurs utilisés

	Sélection chez la bactérie		Sélection chez la plante	
	Antibiotique	Concentration	Antibiotique	Concentration
pK7WG2	Spectinomycine	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Kanamycine	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
pB7WGF2	Spectinomycine	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Glufosinate d'Ammonium	62,5 $\mu\text{L.L}^{-1}$
pH7FWG2	Spectinomycine	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Hygromycine	20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

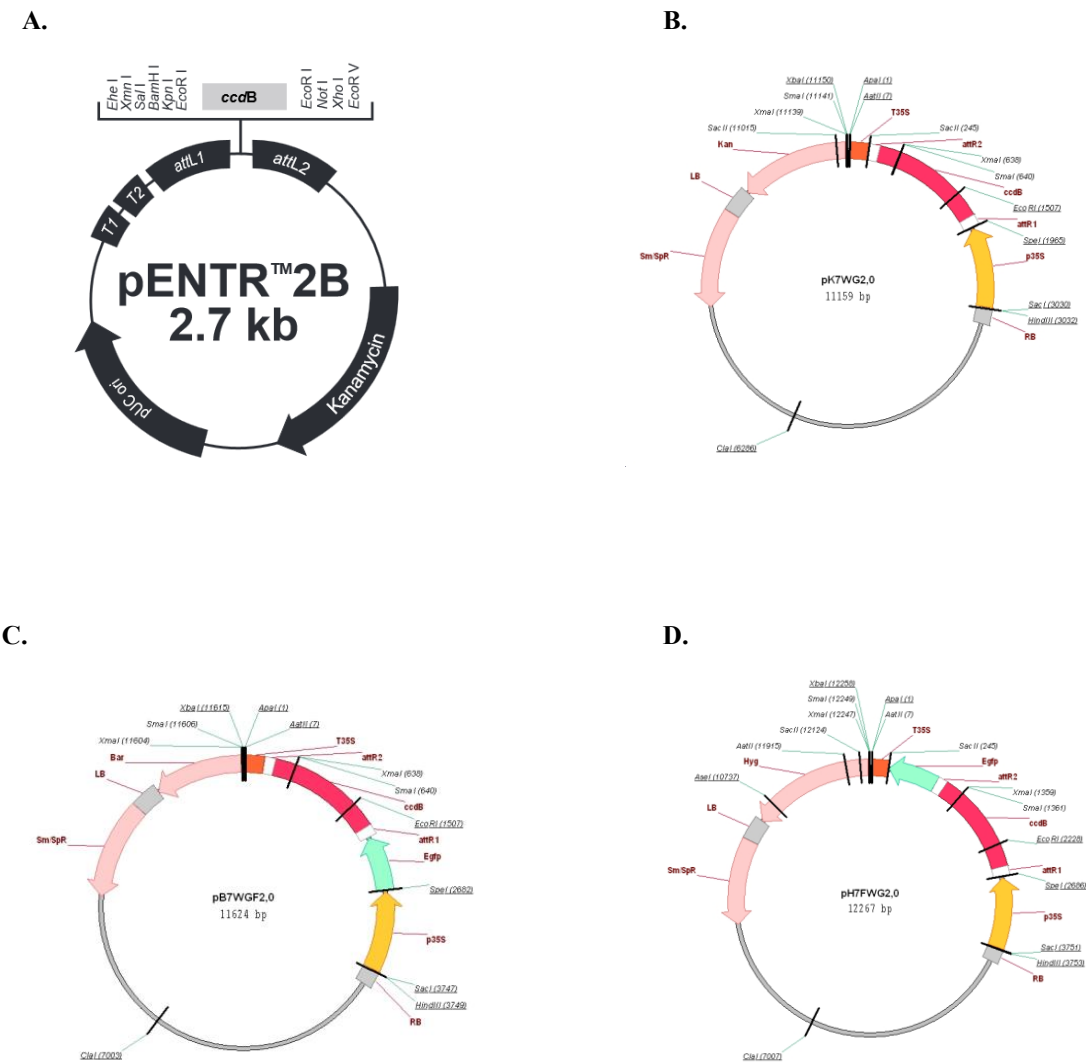


Figure 24 : Plasmides et vecteurs de clonage

VII.2. Oligonucléotides utilisés

Tableau 10 : Amorces utilisées pour les clonages

N°	Oligonucléotide	Séquence
1	For_SalI_DHAR1	5'- GCGCGTCGACAAATGGCTCTGGAAATCTGTGTG-3'
2	Rev_DHAR1_stop_NotI	5'- TTTTGC GGCCGCTTTCAGGGTTAACCTTGGGAG -3'
3	For_SalI_DHAR2	5'- ACGCGTCGACGTATGGCTCTAGATATCTGCGTGAAGG -3'
4	Rev_DHAR2_stop_NotI	5'- ATTTGC GGCCGCTTTCACGCATTACCTTCG -3'
5	For_SalI_DHAR3	5'- ACGCGTCGACGTATGATAAGCCTTAGGTTCAACCAAGC -3'
6	Rev_DHAR3_stop_NotI	5'- ATTTGC GGCCGCTTTTAAACCCATAACCTTTGGTCTCC -3'
8	For_pENTR2B	5'- CCAGGCATCAAATAAGCAG -3'
9	Rev_pENTR2B	5'- CTTGTGCAATGTAACATCAGAG -3'
10	For_SalI_DHAR1	5'- GCGCGTCGACAAATGGCTCTGGAAATCTGTGTG-3'
11	Rev_DHAR1_NotI	5'- TTTTGC GGCCGCTTAGGGTTAACCTTGGGAG -3'
12	For_SalI_DHAR2	5'- ACGCGTCGACGTATGGCTCTAGATATCTGCGTGAAGG -3'
13	Rev_DHAR2_NotI	5'- ATTTGC GGCCGCTTCGCATTACCTTCGATTTC -3'
14	For_SalI_DHAR3	5'- ACGCGTCGACGTATGATAAGCCTTAGGTTCAACCAAGC -3'
15	Rev_DHAR3_NotI	5'- ATTTGC GGCCGCTTACCCATAACCTTTGGTCTCC -3'

Tableau 11 : Amorces utilisées pour le génotypage des lignées mutantes

N°	Oligonucléotide	Séquence	Techniques
1	For_CAT2	5'-CCCAGAGGTACCTCTTCTTCTCCCATG-3'	Génotypage
2	Rev_CAT2	5'-TCAGGGAACTTCATCCCATCGC-3'	Génotypage
3	For_DHAR1	5'-TGGCTCTGGAAATCTGTG-3'	Génotypage
4	Rev_DHAR1	5'-AGCAAGGCATGTTTCAGATCC -3'	Génotypage
5	For_DHAR2	5'-AATGGGTGGCTGATTCTGAC-3'	Génotypage
6	Rev_DHAR2	5'-CCGCAACCACAATCTCTTTC-3'	Génotypage
7	For_DHAR3	5'-GTTACTGACAATGGAGGAGAAG-3'	Génotypage
8	Rev_DHAR3	5'-GTGCCAAGGACAAATCTGC-3'	Génotypage
9	For_GSTU8	5'-AAGAACAGGCCTTCAACCAC-3'	Génotypage
10	Rev_GSTU8	5'-TTGAGGCAAGATCGTGTGAG-3'	Génotypage
11	For_GSTU24	5'-TCTTCTGGATTCTGGGCGAG-3'	Génotypage
12	Rev_GSTU24	5'-CTCGCCGTAACATTACCTG-3'	Génotypage
13	For_GSTF8	ACGGTGATTTGACGCTTTTC	Génotypage
14	Rev_GST F8	TCGTTTATTTGGGCAAAAGG	Génotypage
15	ForPrxIIE	5'-CAAGCTCCCAGACTCCACTC-3'	Génotypage
16	Rev_PrxIIE	5'-TTTCACAACACCATCATCAGC-3'	Génotypage
17	For_PrxIIF	5'-CTAAGATCGGCGGCAAATAG-3'	Génotypage
18	Rev_PrxIIF	5'-TGCTGCTGTGAACAACTCC-3'	Génotypage
19	Lb1	5'-TGGACCGCTTGCTGCAACTCTC-3'	Génotypage
20	LB_Sail	5'-GAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3'	Génotypage
21	LB_Gabi	5'-CCATATTGACCATCATACTCATTGC -3'	Génotypage
22	ForActin2	5'-TTCCCTCAGCACATTCCAGCAG-3'	RT-PCR
23	RevActin2	5'-TTAACATTGCAAAGAGTTTCAAGG-3'	RT-PCR
24	For_CAT2	5'-GTGCTGACTTTCTCCGAGCT-3'	RT-PCR
25	Rev_CAT2	5'-CCTGAACCATCCATGTGCCT -3'	RT-PCR
26	For_DHAR1	5'-TGGCTCTGGAAATCTGTG-3'	RT-PCR
27	Rev_DHAR1	5'-AGCAAGGCATGTTTCAGATCC -3'	RT-PCR
28	For_DHAR2	5'-AATGGGTGGCTGATTCTGAC-3'	RT-PCR
29	Rev_DHAR2	5'-CCGCAACCACAATCTCTTTC-3'	RT-PCR
30	For_DHAR3	5'-GTTACTGACAATGGAGGAGAAG-3'	RT-PCR
31	Rev_DHAR3	5'-GTGCCAAGGACAAATCTGC-3'	RT-PCR
32	For_GSTU8	5'- GAGCACGTAAAGCTTCTGGG -3'	RT-PCR
33	Rev_GST U8	5'- CACGAAATCTTCCGACCAAC -3'	RT-PCR
34	For_GSTU24	5'-GGGATGAGGACAAGAATTGC-3'	RT-PCR
35	Rev_GSTU24	5'-TAGCGACGCTCTCTCTCTCC-3'	RT-PCR
36	For_GSTF8	5'- TCAAGCTCGTCTTCCCTTGT-3'	RT-PCR
37	Rev_GST F8	5'- GGTGCTTGACTTTCTTGC -3'	RT-PCR
38	For_PrxIIE	5'-AAGCTCCCAGACTCCACTCTC-3'	RT-PCR
39	Rev_PrxIIE	5'-TCAGAGAACCCGACTTCGAT-3'	RT-PCR
38	For_PrxIIF	5'-TTATCGGCACTAAGATCGGC -3'	RT-PCR
39	Rev_PrxIIF	5'-GCCTTAACCTTCCCGTCTTC -3'	RT-PCR

Tableau 12 : Amorces utilisées pour les expériences de RT-PCRq

N°	Oligonucléotide	Séquence
1	For_DHAR1	5'-TTGGTGTGGTAATGTTGTTC -3'
2	Rev_DHAR1	5'-AGGCTTCTTATTGATTGATAC -3'
3	For_DHAR2	5'-TCCAGAGGGGAAAGTTCCG -3'
4	Rev_DHAR2	5'-GAGTCTTGAGAGAAGGCTCTGG -3'
5	For_DHAR3	5'-GATGAGAAATGGGTTCCG -3'
6	Rev_DHAR3	5'-CAGGTGGGGTAGCAAGAG -3'
7	For_GSTU24	5'-TCCATAGCTGGTTTGCAGTG -3'
8	Rev_GSTU24	5'-TAGCGACGCTCTCTCTCTCC -3'
9	For_UGT73B3	5'-CCTCACCACACCTCTCAACTC -3'
10	Rev_UGT73B3	5'-TCTGGTAACCCGAGATCCAC -3'
11	For_APX1	5'-GCACTATTGGACGACCCTGT -3'
12	Rev_APX1	5'-GCAAACCCAAGCTCAGAAAG -3'
13	For_GR1	5'-TGGACGCCAGGAAAAGAC -3'
14	Rev_GR1	5'-TTGGTTGCTCCACACTTGAG-3'
15	For_GR2	5'-CCACACACTGTTGATGTAGATGG -3'
16	Rev_GR2	5'-GCTTGAAGGCAAATCAAGC -3'
17	For_Actin2	5'-CTGTACGGTAACATTGTGCTCAG -3'
18	Rev_Actin2	5'-CCGATCCAGACACTGTACTTCC -3'
19	For_RCE1	5'-CTGTTCACGGAACCCAATTCC-3'
20	Rev_RCE1	5'-GGAAAAAGGTCTGACCGACA-3'
21	For_PR1	5'-AGGCTAACTACAACACTACGTGCG-3'
22	Rev_PR1	5'-GCTTCTCGTTCACATAATTCCAC-3'
23	For_PR2	5'-TCAAGGAGCTTAGCCTCACC-3'
24	For_PR2	5'-CGCCTAGCATCCCGTAGC-3'
25	For_ICS1	5'-TTGGTGGCGAGGAGAGTG-3'
26	Rev_ICS1	5'-CTTCCAGCTACTATCCCTGTCC-3'
27	For_PDF1.2A	5'-CCAAACATGGATCATGCAAC-3'
28	Rev_PDF1.2A	5'-CACACGATTTAGCACCAAAGA-3'
29	For_VSP2	5'-TACGACTCCAAAACCGTGTG-3'
30	Rev_VSP2	5'-GACGGTGTCTTCTTTAGGG-3'
31	For_LOX3	5'-GTGGCCGAGTTATCAACC-3'
32	Rev_LOX3	5'-GGGACGTAGCCACCGTAAG-3'
33	For_OPR3	5'-GGCTCAAAGCTCGCTTACC-3'
34	Rev_OPR3	5'-ACTCCCTTGCCCTCCAGACT-3'
35	For_JAZ10	5'-CATCGGCTAAATCTCGTTCG-3'
36	Rev_JAZ10	5'-CGGTACTAGACCTGGCGAGA-3'

VII.3. Programme d'amplification par PCR

Tableau 13 : Programme avec la *Pfu* DNA Polymerase (Promega)

Etapes	Sous-étapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale		94°C	1 min	1 cycle
Phase Amplification 1.				
	Dénaturation	94°C	30 s	10 cycles
	Hybridation	50°C	45 s	
	Synthèse	72°C	15 s	
Phase Amplification 2.				
	Dénaturation	94°C	10 s	20 cycles
	Hybridation	62°C	45 s	
	Synthèse	72°C	15 s	
Extension finale		72°C	3 min	1 cycle

Tableau 14 : Programme avec la *Taq* polymérase (Promega)

Etapes	Sous-étapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation		95°C	5 min	1 cycle
Amplification				
	Dénaturation	95°C	30 s	30 cycles
	Hybridation	60°C	30 s	
	Synthèse	72°C	1 min	
Extension finale		72°C	5 min	1 cycle

Partie VIII. Liste des illustrations

- Figure 1 : Importance des organismes chlorophylliens dans le cycle du carbone, de l'oxygène et dans le flux d'énergie dans la biosphère
- Figure 2 : Plante et contraintes environnementales
- Figure 3 : Différentes voies, non exhaustives, de formation des ROS (radicaux et molécules écrites en rouge)
- Figure 4 : Principales sources des espèces réactives de l'oxygène dans une cellule végétale
- Figure 5 : Site de production des ROS au niveau de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique, PET
- Figure 6 : Site de production des ROS au niveau de la chaîne de transfert d'électrons respiratoire, RET
- Figure 7 : Production des ROS dans les peroxysomes
- Figure 8 : Homologie phénotypique entre *cat2* et des stress abiotique et biotique
- Figure 9 : Schéma simplifié de l'intégration de plusieurs voies de signalisation ROS dans les cellules végétales et diffusion de cellule en cellule du signal ROS
- Figure 10 : Principaux systèmes antioxydants dans une cellule végétale
- Figure 11 : Voie ascorbate-glutathion
- Figure 12 : Importance physiologique du glutathion
- Figure 13 : Synthèse du glutathion
- Figure 14 : Compartimentation de la synthèse, de la réduction et transport du glutathion dans une cellule végétale
- Figure 15 : Différentes voies possibles de dégradation du glutathion dans la cellule végétale
- Figure 16 : Mutant *cat2* comme outil de compréhension du stress biotique, où l'accumulation et l'oxydation du glutathion s'accompagne de l'accumulation de l'acide salicylique et l'induction des gènes de défense
- Figure 17 : Représentation schématique du déclenchement de la production de H₂O₂ chez le mutant photorespiratoire *cat2*
- Figure 18 : Impact d'une fumigation à l'ozone sur le phénotype et la teneur en acide salicylique chez le triple mutant *dhar1 dhar2 dhar3* comparé à Col-0
- Figure 19 : Expression des gènes liés à l'acide jasmonique dans les lignées Col-0, *cat2* et *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*
- Figure 20 : Expression de tous les gènes codant pour la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) chez Col-0 et *cat2*
- Figure 21 : Expression des gènes ABCC
- Figure 22 : Classification hiérarchique des valeurs d'expression obtenues par cDNA-AFLP pour les gènes significativement différents chez Col-0, *cat2*, *dhar1 dhar2 dhar3*, et *cat2 dhar1 dhar2 dhar3*
- Figure 23 : Caractérisation du mutant *cat2 gsnor1*
- Figure 24 : Plasmides et vecteurs de clonage

Partie VIX. Liste des tableaux

Tableau 1 :	Principales espèces réactives de l'oxygène (Halliwell et Gutteridge, 2015)
Tableau 2 :	Principales molécules antioxydantes non-enzymatiques
Tableau 3 :	Principales enzymes de détoxification des ROS
Tableau 4 :	Preuves génétiques de la régulation de la synthèse du GSH par le stress oxydant chez des mutants alléliques KD pour γ -ECS chez <i>Arabidopsis thaliana</i>
Tableau 5 :	Induction des gènes ABCC chez <i>cat2</i>
Tableau 6 :	Liste des lignées d'insertion utilisées
Tableau 7 :	Conditions de culture des plantes
Tableau 8 :	Conditions atmosphériques utilisées pendant la thèse
Tableau 9 :	Marqueurs de sélection pour les vecteurs utilisés
Tableau 10 :	Amorces utilisées pour les clonages
Tableau 11 :	Amorces utilisées pour le génotypage des lignées mutantes
Tableau 12 :	Amorces utilisées pour les expériences de RT-PCRq
Tableau 13 :	Programme avec la Pfu DNA Polymerase (Promega)
Tableau 14 :	Programme avec la Taq polymérase (Promega)

Résumé

Les voies métaboliques les plus importantes dans le contrôle du stress oxydant chez la plante restent à élucider. Celles liées au glutathion jouent un rôle important. Cependant, les réactions responsables de l'oxydation du glutathion (du GSH en GSSG) n'ont pas encore été clairement identifiées. L'analyse des données biochimiques, transcriptomiques et génétiques soulèvent des questions pour mieux comprendre comment la régulation redox liée au stress pourrait influencer sur la signalisation hormonale chez les plantes. Par une approche de génétique inverse utilisant, notamment, le mutant photorespiratoire conditionnel *cat2*, nous avons étudié la réponse et l'importance fonctionnelle de trois voies potentielles, médiées par les glutathion S-transférases, les peroxirédoxines dépendant de la glutarédoxine et les déhydroascorbate réductases (DHARs) chez *Arabidopsis*. Ainsi, l'interaction entre les DHARs semble être nécessaire pour coupler les pools d'ascorbate et de glutathion lors d'un stress oxydant. En complément à l'approche expérimentale, une modélisation mécaniste a permis d'étudier la production de H_2O_2 et son métabolisme, en lien avec l'activité catalase et la voie ascorbate-glutathion. Le modèle révèle que la catalase et l'ascorbate peroxydase prennent en charge de concert le traitement de H_2O_2 , y compris dans les conditions optimales de croissance. Nos simulations suggèrent que la disponibilité en NADPH peut déterminer l'oxydation du glutathion via la monodéhydroascorbate réductase. Nos résultats expérimentaux et le modèle cinétique valident que la sensibilité du statut du glutathion au stress oxydant constitue un senseur approprié des augmentations du H_2O_2 .

Mots clés : glutathion ; peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; photorespiration ; *Arabidopsis* ; déshydroascorbate réductase (DHAR) ; catalase.

Towards a better understanding of antioxidant systems in plants under environmental constraints : experimental approaches and modelling

Abstract

The most important metabolic pathways in oxidative stress control remain to be elucidated in plants. Those linked to glutathione play an important role. However, the reactions responsible for its oxidation have not been clearly identified. Here, analysis based on available biochemical, transcriptomic and genetic data emphasized likely important questions to be elucidated for a full understanding of how stress-related redox regulation might impinge on phytohormone-related signaling pathways. Using a reverse genetics approach and the photorespiratory conditional *cat2* mutant, we studied the response and functional importance of three potential routes for glutathione oxidation pathways mediated by glutathione S-transferases, glutaredoxin dependent peroxiredoxins, and dehydroascorbate reductases (DHAR) in *Arabidopsis* during oxidative stress. Hence, interplay between different DHARs appears to be necessary to couple ascorbate and glutathione pools and to allow glutathione-related signaling during enhanced H_2O_2 metabolism. In addition to experimental work, modelling is another way to investigate H_2O_2 production and its metabolism related to catalase activity and ascorbate glutathione pathway. This approach led to major conclusions, that catalase and ascorbate peroxidase can share the load in H_2O_2 processing even in optimal growth conditions. Furthermore, simulations propose that NADPH availability may determine glutathione oxidation through its influence on monodehydroascorbate reduction. Taken together, experimental results and our kinetic model strengthen that the sensitivity of glutathione status to oxidative stress acts as a suitable sensor of increased H_2O_2 .

Key words : glutathione ; hydrogen peroxide (H_2O_2) ; photorespiration ; *Arabidopsis* ; dehydroascorbate reductase (DHAR) ; catalase.

