



HAL
open science

**La glutarédoxine GRXS17, une chaperonne
redox-dépendante impliquée dans le développement des
racines et dans la thermotolérance chez *Arabidopsis
thaliana***

Laura Martins

► **To cite this version:**

Laura Martins. La glutarédoxine GRXS17, une chaperonne redox-dépendante impliquée dans le développement des racines et dans la thermotolérance chez *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université de Perpignan, 2018. Français. NNT : 2018PERP0044 . tel-02506145

HAL Id: tel-02506145

<https://theses.hal.science/tel-02506145>

Submitted on 12 Mar 2020

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.



THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale
« Énergie et Environnement » ED305

Et de l'unité de recherche
Laboratoire Génome et Développement des Plantes
UMR5096

Spécialité : Biologie

Présentée par Laura Martins

La glutarédoxine GRXS17, une chaperonne redox-dépendante impliquée dans le développement des racines et dans la thermotolérance chez *Arabidopsis thaliana*

Soutenue le 14 décembre 2018 devant le jury composé de

Jean-François Collet – PR, F.R.S- FNRS, Institut de Duve, Bruxelles	Rapporteur
Florence Vignols – CR, CNRS, UMR BPMP, Montpellier	Rapporteur
Jérémy Couturier – MdC, Univ. Lorraine, UMR1136	Examineur
Graham Noctor – PR, Univ. Paris-Sud 11, IPS	Examineur
Cécile Bousquet-Antonelli – DR, CNRS, UMR5096	Examineur
Christophe Riondet – MdC, IUT Perpignan, UMR5096	Co-directeur de thèse
Jean-Philippe Reichheld – DR, CNRS, UMR5096	Directeur de thèse

Remerciements

Tous d'abord, je tiens à remercier l'école doctorale et l'université de Perpignan pour m'avoir permis de réaliser une thèse et pour leur soutien lors de ces trois ans. Je tiens ensuite à remercier les membres du LGDP pour m'avoir accueilli et soutenu dans mes différents projets notamment Christophe et Jean-Philippe. Vos différents enseignements sont précieux, j'ai énormément appris à vos côtés, je vous dois beaucoup et je vous en remercie énormément. Merci à Laetitia pour son aide précieuse au laboratoire, sans oublier Julie et Véronique. Je souhaite enfin remercier les membres de l'équipe pour leur soutien et leurs conseils avisés.

Je souhaiterais ensuite remercier les différents membres du laboratoire, vous avez tous participé à différents niveaux au bon déroulement de ces trois ans de thèse. Je pense d'abord aux plateformes et aux services communs : Marie-Christine, Edouard, Claire, Anne, Michèle, Viviane, Sophie et Christel. Merci Jacinthe pour tes conseils avisés et ton soutien surtout lors de ces derniers mois. Merci à la famille LGDP et ses nombreuses très belles personnes qui la compose avec qui j'ai partagé de très jolies choses. Je pense aussi à Michèle, Edouard (mes mentors), Marie-Christine et Alicia, Jérémy, Jean-René (alias père castor), Rémy, Emilie D. et Elodie B., Julyyy, Nathalyyy, Guillaume, Belin, Avilien et Valy qui m'ont beaucoup soutenu. Je remercie l'équipe Lagrange et le duo Dom et Sylvie pour notamment leur aide à la paillasse et leur conseil sur les expériences. Une attention particulière à toi Sylvie pour tes conseils et ta précieuse aide sur le manuscrit. Sans oublier les personnes qui m'ont conseillé, aidé, épaulé, soutenu lors de la rédaction de ce manuscrit. Puis, à l'ensemble des membres du laboratoire, encore une fois, merci !

J'aimerais ensuite remercier chaleureusement les différentes personnes qui m'ont entouré lors de ces trois ans. Votre présence a été précieuse chaque jour et je ne saurai jamais assez vous remercier... Parmi vous, la famille penta : ces gens formidables qui ont été une force, en plus de ce sport incroyable, pour avancer tous les jours. Montpellier, avec la famille Master : Chloé, Benoit, Ianou, Marianne, Astrid, et tous les autres.... et toute la bande de BPMP, d'abord mes encadrants de master et les équipes associées avec qui j'ai énormément appris (un grand merci !) Jossia, Amel, Fred, Tou Cheu, Cyril et vous autres... Je pense à mes amis de toujours

et de maintenant, ces personnes en or, à leur énorme soutien. Puis à toi, qui a été là, d'une patience sans faille, d'un réconfort absolu, une vraie épaule sur qui j'ai pu m'appuyer ces derniers mois.

Pour finir, les membres de ma famille, qui sans vous, rien de cela ne serait possible. A ces femmes fortes (le mot est faible) qui m'ont entouré, ont été mes exemples et m'ont appris beaucoup de choses, et, encore très récemment, que la vie c'était un combat qu'il fallait mener tous les jours. Au sang, à ce trio infailible que nous formons, à toi qui m'as montré l'exemple et à toi qui sais trouver les mots qui me font avancer. Je crois que ces derniers mots de suffiront pas à exprimer toute la gratitude que j'ai envers Toi, tu as su faire de ce trio, les personnes que nous sommes aujourd'hui. C'est grâce à toi que j'en suis arrivée là donc je te dis tout simplement merci !

Enfin, à ces petites étoiles qui m'ont suivi jusqu'ici et à Toi, qui étais au plus près de moi pendant tout ce temps... .

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADN-T	Acide désoxyribonucléique de transfert
ADP	Adénosine diphosphate
APX	Ascorbate peroxydase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATP	Adénosine triphosphate
BT	Thermotolérance basale
CAT	Catalase
CO	Centre organisateur
CQ	Centre quiescent
DNAse	Acide désoxyribonucléase
DTT	dithiothréitol
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GFP	Green fluorescent protein
GPX	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductases
GRX	Glutarédoxine
GSH	Glutathion sulfhydryle
GSNO	Nitrosoglutathion
GSSG	Disulfure de glutathion
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FTR	Ferrédoxine-thiorédoxine réductase
HSF	Facteur de stress thermique
HSP	Protéine de choc thermique
HSR	Réponse au stress thermique
KD	Knock-down
KO	Knock-out
LAT	Thermotolérance acquise à long terme

MAC	Méristème apical caulinaire
MAR	Méristème apical racinaire
MCP	Mort cellulaire programmée
MDH	Malate déshydrogénase
NAD⁺	Nicotinamide adénine dinucléoside oxydé
NADH	Nicotinamide adénine dinucléoside réduit
NADP⁺	Nicotinamide adénine dinucléoside phosphate oxydé
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléoside phosphate réduit
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear localization sequence
NO	Oxyde nitrique
NTR	Thiorédoxine réductase dépendante du NADPH
RT-qPCR	Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PDI	Protéines disulfures isoméras
RubisCO	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAT	Thermotolérance acquise à court terme
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
TAIR	The arabidopsis information resource
TBS-T	Tris buffer saline + Tween
TMHT	Thermotolérance à des températures modérément élevées
TRX	Thiorédoxine
WT	Wild type (type sauvage)
ZC	Zone Centrale
ZM	Zone méristématique

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I. Généralités : présentation du modèle d'étude.....	1
I.1 Le cycle de développement d' <i>Arabidopsis thaliana</i> :.....	1
I.2 La croissance de la plante :	3
I.2.1 La croissance racinaire :	5
I.2.2 La croissance foliaire :	6
I.2.3 La reproduction :	7
II. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) :	9
II.1 Généralités :	9
II.2 Génération de ROS par les organismes photosynthétiques : exemple de la photosynthèse.....	11
II.3 Les ROS et la croissance de la plante :	15
III. Les plantes face aux stress environnementaux : l'exemple du stress thermique.....	17
III.1 La perception du stress thermique et la transduction du signal : rôle des membranes plasmiques, du calcium, des protéines kinases, des HSF et des ROS	17
III.1.1 Présentation des facteurs du choc thermique (HSF) :	19
III.1.2 La production de ROS lors du stress thermique :	19
III.1.3 Le rôle des HSF et des ROS dans l'induction de la réponse au stress thermique (HSR) :	21
III.2 L'induction des gènes de réponse au stress thermique (HSR) :	23
III.3 Les protéines chaperonnes : fonctions et familles	25

III.3.1	Le rôle des protéines chaperonnes :	25
III.3.2	Les différents types de chaperonnes :	25
III.3.2.1	Les foldases :	27
III.3.2.2	Les holdases :	27
III.3.2.3	Les protéines présentant les deux fonctions : holdase et foldase	29
III.3.2.3.1	Protéine chaperonne pour seule activité : le cas de Spy chez E. Coli	29
III.3.2.3.2	Protéines présentant une double activité chaperonne en plus d'une autre fonction enzymatique :	29
III.4	Les mécanismes de régulation des protéines chaperonnes :	31
III.5	Etude de la thermotolérance chez les plantes :	33
IV.	Le contrôle du stress oxydatif :	37
IV.1	Par la détoxification des ROS :	37
IV.1.1	Les molécules anti-oxydantes :	37
IV.1.1.1	L'ascorbate :	37
IV.1.1.2	Le glutathion :	37
IV.1.2	Les enzymes anti-oxydantes :	39
IV.2	Par les systèmes de réduction :	39
IV.2.1	L'oxydation des thiols :	39
IV.2.2	La réduction des thiols par les TRX et les GRX :	41
IV.2.2.1	La réduction et l'isomérisation des ponts disulfures :	43
IV.2.2.2	La déglutathionylation :	45
IV.2.2.3	La dénitrosylation :	45
V.	Les TRX et GRX chez les plantes :	46
V.1	Signalisation redox à base de thiol dans le noyau végétal (Revue) :	46
V.2	Les TRX chez les plantes :	49

V.3	Les GRX chez les plantes :.....	51
V.3.1	Présentation des GRX de plantes :.....	51
V.3.2	Le rôle des GRX dans le développement de la plante et la réponse aux stress :.....	55
V.3.3	Les Glutarédoxines et les cœurs Fer-Soufre :.....	57
V.3.3.1	Les cœurs fer-soufre (Fe-S) :.....	57
V.3.3.2	Le rôle des chaperonnes dans le transfert des cœurs Fe-S : l'exemple de l'HSP70 mitochondriale de levure.....	59
V.3.3.3	Les GRX à cœur Fe-S :.....	59
VI.	Les GRX de classe II d'<i>Arabidopsis thaliana</i> :.....	63
VI.1	Les glutarédoxines GRXS14 et GRXS16 :.....	63
VI.1.1	La glutarédoxine GRXS14 :.....	63
VI.1.2	La glutarédoxine GRXS16 :.....	65
VI.2	La glutarédoxine GRXS15 :.....	65
VII.	La glutarédoxine GRXS17 :.....	67
VII.1	Généralités :.....	67
VII.2	La GRX3 de mammifères et les Grx3/Grx4 de levure : des orthologues de GRXS17.....	67
VII.2.1	Les Glutarédoxines 3 et 4 de levure :.....	67
VII.2.2	La Glutarédoxine 3 de mammifères :.....	69
VII.3	L'expression et la localisation de GRXS17 :.....	71
VII.4	GRXS17, une protéine à cœur Fe-S :.....	71
VII.5	Rôle de GRXS17 dans la croissance de la plante :.....	72

VII.6	Rôle de GRXS17 dans la réponse aux stress environnementaux :	73
VII.7	Les autres rôles connus de GRXS17 :	74
VIII.	L'objectif de la thèse :	77
CHAPITRE 1 : Caractérisation phénotypique du mutant <i>grxs17</i> et étude de la relation entre la structure et la fonction de la protéine GRXS17 à 20°C, à 28°C et à 35°C		
81		
I.	Caractérisation phénotypique du mutant <i>grxs17</i> :	83
I.1	Mesure de la croissance racinaire de <i>grxs17</i> à 20° et à 28°C :	85
I.2	Observation du méristème racinaire du mutant <i>grxs17</i> :	87
I.3	Etude de la croissance foliaire et de la floraison de <i>grxs17</i> à 22°C et à 28°C :	89
I.4	Mesure de la thermotolérance de <i>grxs17</i> après l'application des régimes thermiques de type LAT, SAT et TMHT :	93
I.5	Caractérisation du mutant <i>grxs15^{KD}</i> et du double mutant <i>grxs15^{KD}grxs17</i> :	95
II.	Etude structure/fonction de la protéine GRXS17 par l'utilisation de lignées complémentées :	97
II.1	Utilisation de lignées complémentées afin de déterminer le rôle de la localisation de GRXS17 :	99
II.1.1	Etude de la lignée complémentée 35S:GRXS17-GFP :	99
II.1.2	Analyse de la localisation nucléaire avec la lignée 35S:NLS-GRXS17 :	103
II.1.3	Etude du rôle de la localisation dans la croissance foliaire et la floraison à 22°C et à 28°C : ..	105
II.1.4	Rôle de GRXS17 et de sa localisation dans la thermotolérance :	107
II.2	Utilisation de lignées complémentées pour déterminer le rôle des cystéines :	109
II.2.1	Etude du rôle des cystéines dans la croissance racinaire :	109
II.2.2	Analyse du rôle des cystéines dans la thermotolérance :	115

II.2.3	Etude de la vitesse d'élongation de la racine primaire après l'application d'un stress thermique de 3 jours à 35°C :	117
II.3	Utilisation de lignées complémentées pour déterminer le rôle des différents domaines de GRXS17 :	121
II.3.1	Etude du rôle des domaines de GRXS17 dans la croissance racinaire :	121
II.3.2	Analyse de la fonction de l'unique domaine GRX de GRXS14 dans la croissance foliaire et la floraison à 22°C et à 28°C :	127
II.3.3	Rôle des domaines de GRXS17 dans la thermotolérance :	129
II.4	Présentation des autres lignées complémentées utilisées :	131
DISCUSSION		133
I.	GRXS17 est importante dans la croissance à des températures normales et plus élevées et confère la thermotolérance à la plante :	133
II.	La localisation nucléaire semble nécessaire à la thermotolérance conférée par GRXS17 :	134
III.	Les cystéines des sites actifs sont importantes dans la croissance de la plante et dans la thermotolérance :	135
IV.	Le seul domaine de GRXS14 complète la fonction de GRXS17 dans la croissance à 20°C et à 22°C et dans la thermotolérance :	136
<u>CHAPITRE 2 : La glutarédoxine GRXS17 à cœurs Fe-S est une protéine chaperonne rédox-dépendante</u>		141
I.	Article soumis : Fast redox response of iron-sulfur glutaredoxin GRXS17 activates its holdase activity	142
II.	Description complémentaire de la recherche de cibles et/ou de partenaires :	191
DISCUSSION		195
<u>CHAPITRE 3 : Recherche de(s) fonction(s) par des analyses globales : étude du transcriptome et du métabolome de <i>grxs17</i></u>		203

I.	Analyse transcriptomique du mutant <i>grxs17</i> soumis à des températures élevées :	203
I.1	Présentation de la stratégie et validation de l'expérience :	203
I.2	Analyse des données d'expression des transcrits de <i>grxs17</i> vs Col-0 à 20°C, 2h et 24h à 28°C :	204
I.3	Classification des listes de gènes en groupe de protéines orthologues (COG) :	207
I.3.1	Etude des listes de gènes induits chez Col-0 et <i>grxs17</i> par l'augmentation de la température :	209
I.3.2	Etude des listes de gènes réprimés chez Col-0 et <i>grxs17</i> par l'augmentation de la température :	213
I.4	Représentation des données d'expression par cartes thermiques (heatmap) :	215
I.4.1	Etude des listes de gènes induits par l'augmentation de la température chez Col-0 et comparaison avec <i>grxs17</i> :	215
I.4.2	Etude des gènes réprimés par l'augmentation de la température chez Col-0 et comparaison avec <i>grxs17</i> :	219
II.	Analyse métabolomique de <i>grxs17</i> à 20°C et à 28°C :	223
	DISCUSSION	229
I.	La réponse à l'augmentation à la température est dérégulée et retardée chez <i>grxs17</i> :	229
II.	La réponse métabolomique face à l'augmentation de la température est dérégulée chez <i>grxs17</i> :	231
	DISCUSSION GENERALE	237
I.	GRXS17 est un acteur de la croissance de la plante :	237
II.	GRXS17 est une protéine chaperonne redox-dépendante :	239
III.	GRXS17 dans des fonctions nucléaires :	241
	MATERIEL ET METHODES	247
I.	Matériel biologique :	247
I.1	Les souches bactériennes :	247

I.2	Le matériel végétal :	247
II.	Les Méthodes :	249
II.1	Les conditions classiques de cultures végétales :	249
II.1.1	La culture végétale sur milieu gélosé :	249
II.1.2	La culture végétale en terreau :	249
II.2	La génération de lignées transgéniques stables :	251
II.2.1	Le clonage du gène, la mutagénèse et la construction des plasmides :	251
II.2.2	La transformation des plantes par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> :	251
II.3	L'étude de la croissance racinaire :	252
II.3.1	Conditions de croissance :	252
II.3.2	La mesure de la longueur moyenne de la racine primaire :	252
II.3.3	La mesure de la vitesse d'élongation moyenne de la racine primaire :	252
II.3.4	L'étude du méristème apical racinaire :	253
II.4	L'étude de la croissance aérienne :	253
II.5	L'étude de la thermotolérance :	254
II.5.1	Présentation de la méthode :	254
II.5.2	Utilisation des régimes SAT, LAT et BT :	254
II.5.3	Utilisation du régime TMHT :	255
II.6	L'observation des protéines taguées au microscope confocal :	255

II.7	Les analyses globales :	257
II.7.1	Analyse du transcriptome par RNAsequencing :	257
II.7.1.1	Plan de l'expérimentation :	257
II.7.1.2	Extraction de l'ARN :	257
II.7.1.3	Validation par RT-qPCR :	259
II.7.1.3.1	Le traitement DNase :	259
II.7.1.3.2	La transcription inverse en ADNc :	259
II.7.1.3.3	La PCR quantitative :	259
II.7.1.4	Séquençage et traitement des données :	259
II.7.2	Etude du métabolome :	260
II.8	La génération de protéines recombinantes :	261
II.8.1	Clonage du gène, mutagenèse et insertion dans le plasmide d'induction :	261
II.8.2	La production et la purification de protéines recombinantes :	261
II.9	Etude des activités foldase et holdase :	262
II.10	Méthodes liées aux protéines :	262
II.10.1	Extraction des protéines :	262
II.10.1.1	Extraits totaux de protéines :	262
II.10.1.2	Extraits de protéines solubles pour les IP et la FPLC :	263
II.10.2	Analyse par western blot :	263
II.10.2.1	L'utilisation des gels dénaturants SDS-Page :	263
II.10.2.2	L'utilisation des gels natifs :	264
II.11	Chromatographie d'exclusion par la taille :	265
II.11.1	Avec la colonne superose 6 :	265
II.11.2	Avec la colonne sephacryl S300 HR :	265

II.12	Recherche de cible et/ou de partenaires par immunoprécipitation :	266
II.12.1	Plan de l'expérimentation :	266
II.12.2	Immunoprécipitation :.....	266
BIBLIOGRAPHIE	271

INTRODUCTION

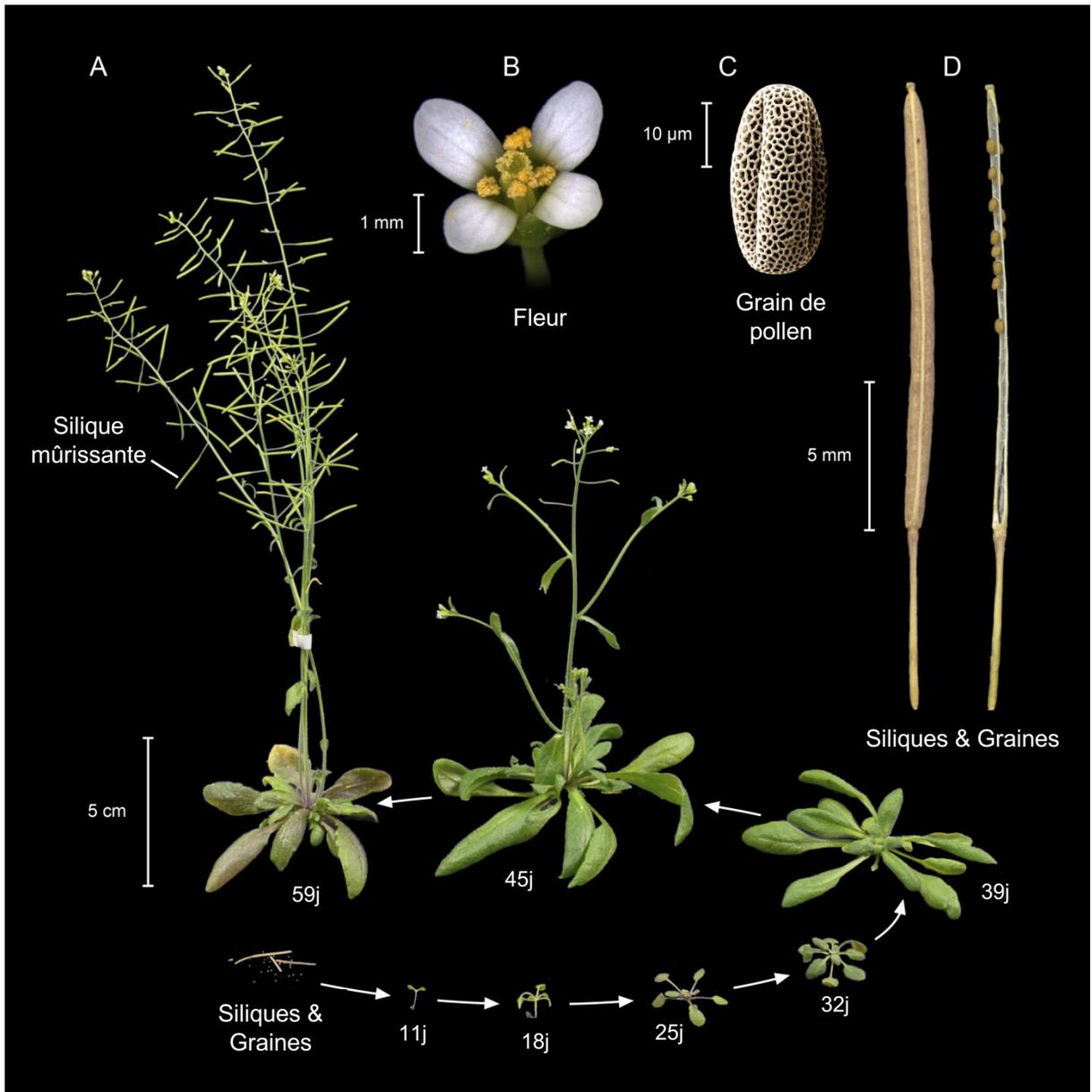


Figure 1 : Cycle de vie d'*Arabidopsis thaliana*.

(A) Les différents stades du cycle de vie d'*A. thaliana* (accession Columbia) : les graines provenant des siliques, la plantule (11 jours), la croissance végétative (39 jours), et la phase de reproduction (45 jours). Photographie à différents grossissements de la fleur (B), du grain de pollen (microscopie électronique à balayage) (C) et des siliques mûres (à gauche : silique fermée ; à droite : ouverte avec quelques graines restantes) (D). Les racines ne sont pas représentées dans cette figure. Adaptée de Krämer, 2015.

INTRODUCTION

Ce manuscrit réunit les recherches menées sur la glutarédoxine S17 (GRXS17) durant ces trois dernières années (Octobre 2015 à Septembre 2018). Les travaux ont été orientés vers une recherche de la fonction moléculaire de cette protéine dans deux différentes voies : la croissance racinaire et la thermotolérance. Comme vous allez le découvrir au fur et à mesure de votre lecture, GRXS17 est importante dans différents tissus, différentes voies et également lors des changements environnementaux. Différentes pistes ont été explorées et ont mené à de nombreux résultats. L'introduction qui va suivre est assez large et regroupe ces différents axes explorés.

Bonne lecture,

I. Généralités : présentation du modèle d'étude

Les plantes supérieures terrestres sont des organismes multicellulaires généralement fixés, photosynthétiques et autotrophes existant depuis des millions d'années. *Arabidopsis thaliana* est une plante modèle étudiée en laboratoire qui appartient à la famille des Brassicacées. Cette plante à fleurs est une dicotylédone ayant un cycle de vie court de huit semaines graine à graine.

I.1 Le cycle de développement d'*Arabidopsis thaliana* :

Le cycle de développement d'*Arabidopsis thaliana* et plus généralement des plantes à fleurs se déroule en plusieurs étapes et débute par la germination de la graine (Figure 1A) (Krämer, 2015). Elle est caractérisée par l'absorption d'eau par la graine et la formation d'une radicule et d'une pousse composée d'un ou de deux primordia foliaires (monocotylédones ou dicotylédones). Cette germination est permise lorsque les conditions sont propices (eau, température, lumière et oxygène) et est régulée par les gibbérellines sécrétées par l'embryon, hormones permettant l'utilisation des réserves nutritives de l'albumen par ce dernier. Une fois la germination terminée, la plantule va débiter sa phase de croissance (phase végétative) et développer ses différents organes. Parmi eux, il y a les feuilles qui permettent d'effectuer la photosynthèse, la respiration et la transpiration.

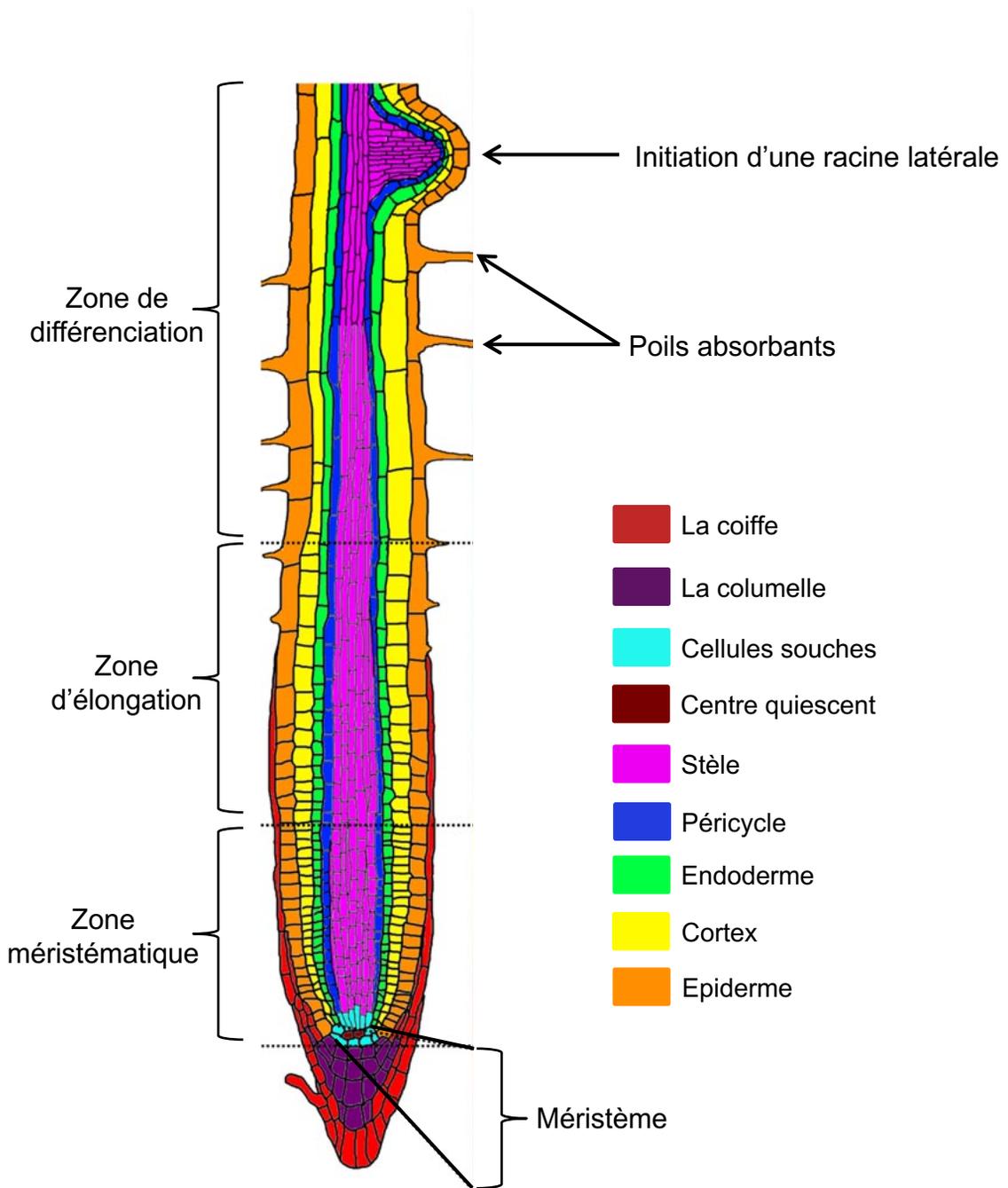


Figure 2 : Représentation schématique d'une section longitudinale de la racine d'*Arabidopsis thaliana*.

Schématisation d'une racine primaire, des poils absorbants et de l'initiation d'une racine latérale. Les différentes couches cellulaires de la racine sont représentées par différentes couleurs. La racine primaire est composée de trois zones distinctes : la zone méristématique, la zone d'élongation et la zone de différenciation où s'initient les racines latérales. Modifiée de Somssich et al., 2016.

Arabidopsis thaliana présente un appareil foliaire proche du sol formant une rosette. L'appareil racinaire est composé d'une racine primaire, de racines secondaires et de poils absorbants (Somssich et al., 2016) (Figure 2). Les racines sont importantes pour l'absorption de nutriments et d'eau mais aussi pour la structure en fixant la plante dans le sol. Enfin, la plante va terminer sa croissance végétative et débiter sa phase reproductrice en développant son appareil reproducteur (Figure 1A). *Arabidopsis thaliana* va commencer par générer une hampe florale principale composée d'une tige et de fleurs (organes reproducteurs), puis des hampes florales secondaires. Son mode de fécondation est de type autogame, elle va générer des graines qui seront contenues dans des siliques fines et allongées (Figure 1A-D).

I.2 La croissance de la plante :

La croissance des plantes est régulée par deux paramètres : le nombre de cellules et leur taille. Pour le premier paramètre, les cellules accomplissent la mitose afin de se dupliquer, ce phénomène s'appelle la prolifération cellulaire (mèrese). Pour le second paramètre, les cellules augmentent la taille de leur vacuole et s'accroissent par expansion cellulaire (auxèse). Le développement des organismes multicellulaires repose sur le maintien d'un pool de cellules souches. Chez les plantes, ces cellules sont intégrées dans des tissus appelés méristèmes qui offrent un environnement dédié pour l'auto-renouvellement à long terme, ces cellules indifférenciées se divisant indéfiniment par mitose (Wendrich and Weijers, 2013). Il existe deux méristèmes : les méristèmes apicaux importants pour la croissance longitudinale et l'élaboration des organes (feuilles, fleurs, bourgeons axillaires et racines) et les méristèmes latéraux impliqués dans la croissance radiale. Il y a deux types de méristème apical : le méristème apical caulinaire (MAC) et racinaire (MAR) (Figure 3). La division cellulaire des cellules souches génère de nouvelles cellules filles qui, une fois déplacées de ce réservoir de cellules souches, accomplissent d'autres divisions cellulaires. Ces cellules filles vont ensuite se différencier en un type de cellules spécifiques (Sablowski, 2007).

Le contrôle hormonal est un facteur clé de la croissance. Des hormones telles que l'éthylène, les gibbérélines, les cytokinines et l'auxine jouent un rôle primordial dans la croissance de la plante (Achard et al., 2003, 2009; Dello Ioio et al., 2007; Finet and Jaillais, 2012; Vanstraelen and Benková, 2012). Ce contrôle hormonal se produit à tous les stades de la croissance des plantes. Par exemple, les phytohormones comme l'auxine, les cytokinines, l'éthylène, l'acide abscissique, les gibbérélines et les brassinostéroïdes jouent un rôle important dans la croissance aérienne (Kurakawa et al., 2007; Sablowski, 2007; Yruela, 2015). Dans les racines, l'auxine, les cytokinines, l'éthylène et les gibbérélines sont les principaux régulateurs de la prolifération et l'expansion de la racine

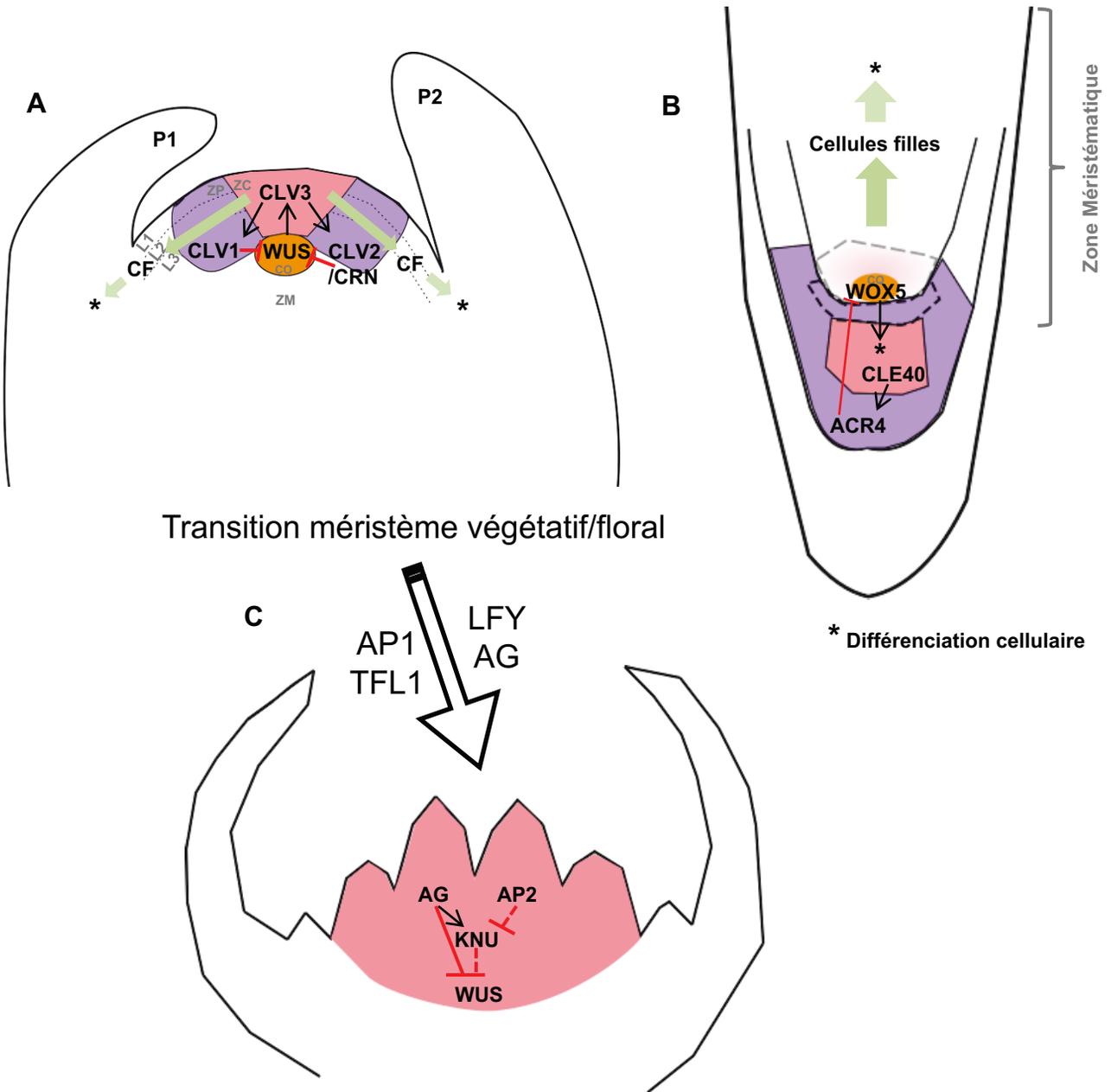


Figure 3 : Représentation schématique des méristèmes apicaux caulinaire (MAC), racinaire (MAR) et du méristème floral.

(A) Schéma du méristème apical caulinaire composé du centre organisateur (CO) se trouvant dans la zone centrale (ZC) puis de la zone périphérique (ZP), de la zone médullaire (ZM), des couches cellulaires L1 et L2 (tunica) et L3 (corpus) et des deux primordia foliaires P1 et P2. Les couleurs représentent les zones d'expression des différents gènes : en orange WUS dans le CO, en rose CLV3 dans la ZC et en violet CLV1 et CLV2/CRN dans la ZC et la ZP. (B) Schéma du méristème apical racinaire composé de la zone méristématique où se trouve le centre quiescent (CQ). Les couleurs représentent les zones d'expression des différents gènes : WOX5 dans le CQ, CLE40 et ACR4 dans les cellules de la columelle. (C) Schéma d'un méristème floral au stade 6 qui a évolué à partir d'un méristème végétatif (inspiré de Huang et al., 2017) . En rose, la zone d'expression d'AG, KNU, WUS et AP2.

(Ubeda-Tomás et al., 2009; Schaller et al., 2015; Vanstraelen and Benková, 2012; Yamada and Sawa, 2013).

Enfin, d'autres éléments sont impliqués dans la croissance de la plante. Il s'agit des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de la signalisation redox (impliquant les systèmes de réduction) (Considine and Foyer, 2014; Schmidt and Schippers, 2015; Rouhier et al., 2015; Kocsy et al., 2013; Tsukagoshi, 2016). Les rôles de ces deux éléments sont exposés respectivement dans les paragraphes II.3. et V.3.2.

I.2.1 La croissance racinaire :

La croissance des racines est la balance entre la prolifération cellulaire et la différenciation à la pointe de la racine (Petricka et al., 2012). Comme vu précédemment, l'appareil racinaire est composé d'une racine primaire et de racines secondaires (Figure 2) (Somssich et al., 2016). La racine primaire est composée de 3 zones distinctes : la zone méristématique (MAR), la zone d'élongation et la zone de différenciation où s'initient les racines latérales (ou secondaires). Elle est composée de différentes couches cellulaires qui possèdent toutes une fonction bien définie (Figure 2). Par exemple, la coiffe radriculaire qui protège le méristème apical racinaire (MAR), contrôle le gravitropisme de la racine au niveau des cellules de la columelle *via* les amyloplastés (Baldwin et al., 2013). Les racines secondaires, issues du péricycle situé autour du faisceau conducteur, accroissent l'étendue de l'appareil racinaire en fournissant une architecture racinaire ramifiée (Vermeer and Geldner, 2015). Elles ont une morphologie comparable à celle de la racine primaire et possèdent un méristème apical racinaire que l'on appelle méristème dérivé. Enfin, les poils absorbants, situés dans la zone de différenciation, sont constitués d'une seule cellule très allongée du fait de leur grande vacuole. Ces poils, présents en très grand nombre, notamment sur les racines latérales, permettent d'absorber des sels minéraux et de l'eau par osmose.

Le MAR contient la réserve de cellules souches, comprenant les cellules du centre quiescent (CQ), rarement en division et elles contrôlent les cellules souches environnantes (aussi appelées cellules initiales) (Figure 3B). Après la division d'une cellule initiale, la cellule fille s'allonge et commence alors à se différencier dans la zone d'élongation (Beemster and Baskin, 1998). La zone de maturation ou différenciation est ainsi caractérisée par des cellules qui ont terminé l'allongement et qui sont fortement engagées dans la différenciation, y compris le développement des poils absorbants et la formation de tissus vasculaires (Caño-Delgado et al., 2010). Le développement de la racine est donc déterminé par l'activité dans ces trois zones. D'autres éléments clés jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement du MAR et dans le développement racinaire (Figure 3B). Un homologue proche de

WUSCHEL (WUS), le facteur de transcription WOX5, qui est exclusivement exprimé dans les cellules du CQ, maintient la réserve de cellules souches (De Smet et al., 2007). CLE40, homologue de CLV3, contrôle la prolifération des cellules souches en inhibant WOX5 *via* le récepteur ACR4 (Hobe et al., 2003; De Smet et al., 2008; Stahl et al., 2009).

I.2.2 La croissance foliaire :

La croissance foliaire est caractérisée par le développement de nouvelles tiges et feuilles. Elle est permise par l'activité du MAC. Le MAC est établi pendant l'embryogenèse et donne naissance à tous les tissus aériens d'une plante. Lors de la phase végétative, il produit des feuilles et lors de la phase de reproduction, le système reproductif. Le MAC est une partie non différenciée de l'apex aérien situé au dessus de la feuille la plus jeune (Figure 3A) (Gaillochet et al., 2015).

Le MAC peut être divisé en trois zones fonctionnelles : la zone centrale (ZC), la zone périphérique et la zone médullaire (Figure 3A). La ZC abrite le centre organisateur (CO) et les cellules souches assurant le maintien du méristème. Le nombre de cellules souches est limité et leurs cellules filles sont déplacées vers la périphérie pendant le développement où elles peuvent entrer dans une voie de différenciation. C'est donc une région où les cellules méristématiques initient la formation d'organes. La zone méristématique (ZM), quant à elle, produit les tissus internes de la tige. Chez *Arabidopsis thaliana*, le facteur de transcription à homéodomains WUSCHEL (WUS) exprimé dans le CO, va permettre la multiplication et le maintien d'une réserve de cellules souches (Figure 3A) (Mayer et al., 1998). Le nombre de cellules souches produites est contrôlé afin de maintenir un niveau constant de cellules par l'action du petit peptide CLAVATA3 (CLV3) sécrété dans la zone centrale (Brand et al., 2000; Ohyama et al., 2009). Il s'agit d'une boucle de rétroaction où CLV3 se lie au récepteur de kinase CLAVATA1 (CLV1) ce qui va inhiber l'expression de WUS (Ogawa et al., 2008). Le nombre de cellules souches va alors décroître ainsi que l'expression de CLV3 ce qui va favoriser l'expression de WUS et donc augmenter le nombre de cellules souches. CLV3 est également impliqué dans une seconde voie d'inhibition qui comprend CLAVATA2 (CLV2) (Jeong et al., 1999) et la kinase CORYNE (CRN) (Muller et al., 2008), qui peuvent interagir via leurs domaines transmembranaires pour reconstituer un récepteur fonctionnel et inhiber WUS (Figure 3A). Le système de régulation est donc assez similaire entre le MAC et le MAR avec des protéines homologues mais à la différence de CLE40, CLV3 provient des cellules différenciées et non des cellules souches comme cette dernière.

I.2.3 La reproduction :

Comme pour la croissance aérienne et racinaire plusieurs éléments entrent en jeu où les phytohormones comme l'auxine, les cytokinines, l'éthylène, l'acide abscissique, les gibbérellines et les brassinostéroïdes jouent un rôle important. Lorsque la plante débute la transition de la phase végétative à la phase reproductrice, le MAC va évoluer en méristème floral par l'expression de nouveaux gènes, tels que LEAFY (LFY), AGAMOUS (AG), APETALA 1 (AP1) et TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) qui vont permettre le passage du méristème végétatif au méristème floral (Figure 3C) (Deant, 1998). L'expression de WUS va diminuer progressivement au cours du développement floral à cause d'AG (Lohmann et al., 2001). AG est exprimée au centre de la fleur et favorise la formation d'étamines et de carpelles (depuis les cellules souches). La protéine AG active l'expression de KNUCKLES (KNU), un répresseur transcriptionnel de type doigt de zinc, en se liant à sa région promotrice (Figure 3C) (Payne et al., 2004; Sun et al., 2009). Cependant, la répression de WUS par KNU reste hypothétique. Enfin, des récentes études suggèrent que AP2 pourrait réprimer l'expression de KNU (Huang et al., 2017). Il servirait à réguler la boucle AG/KNU/WUS afin de maintenir un équilibre.

La floraison est caractérisée par la croissance d'une hampe florale primaire et des hampes florales secondaires portant toutes les boutons floraux (Figure 1A). La fleur s'organise de la manière suivante : quatre sépales, quatre pétales, six étamines et deux carpelles (Figure 1B). Une fois la fécondation accomplie dans la fleur par la rencontre du pollen et de l'ovule *via* le tube pollinique, des siliques fines possédant les graines à l'intérieur vont se former (Figure 1A, C et D). Les siliques matures vont sécher ce qui va fragiliser son enveloppe et permettre la dissémination des graines (Figure D) et le début d'un nouveau cycle si les conditions environnementales sont favorables (Figure 1A). Lors de ce nouveau cycle, la plante peut faire face à des variations environnementales externes l'obligeant à maintenir un équilibre interne.

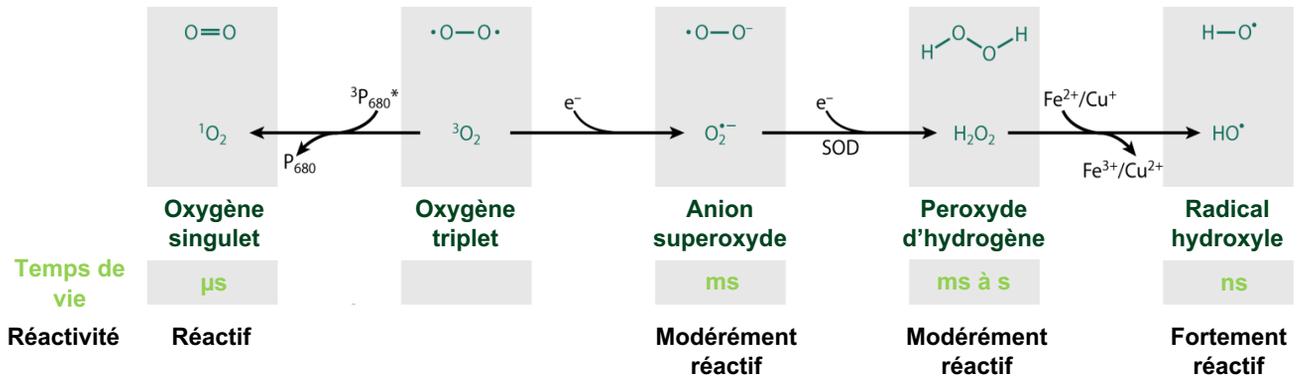


Figure 4 : Génération et structures chimiques d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Les électrons sont représentés sous forme de points. Abréviations: $^3P_{680}^*$, état de triplet du donneur primaire d'électrons du photosystème II ; SOD, superoxyde dismutase. Modifiée de Waszczak et al., 2018.

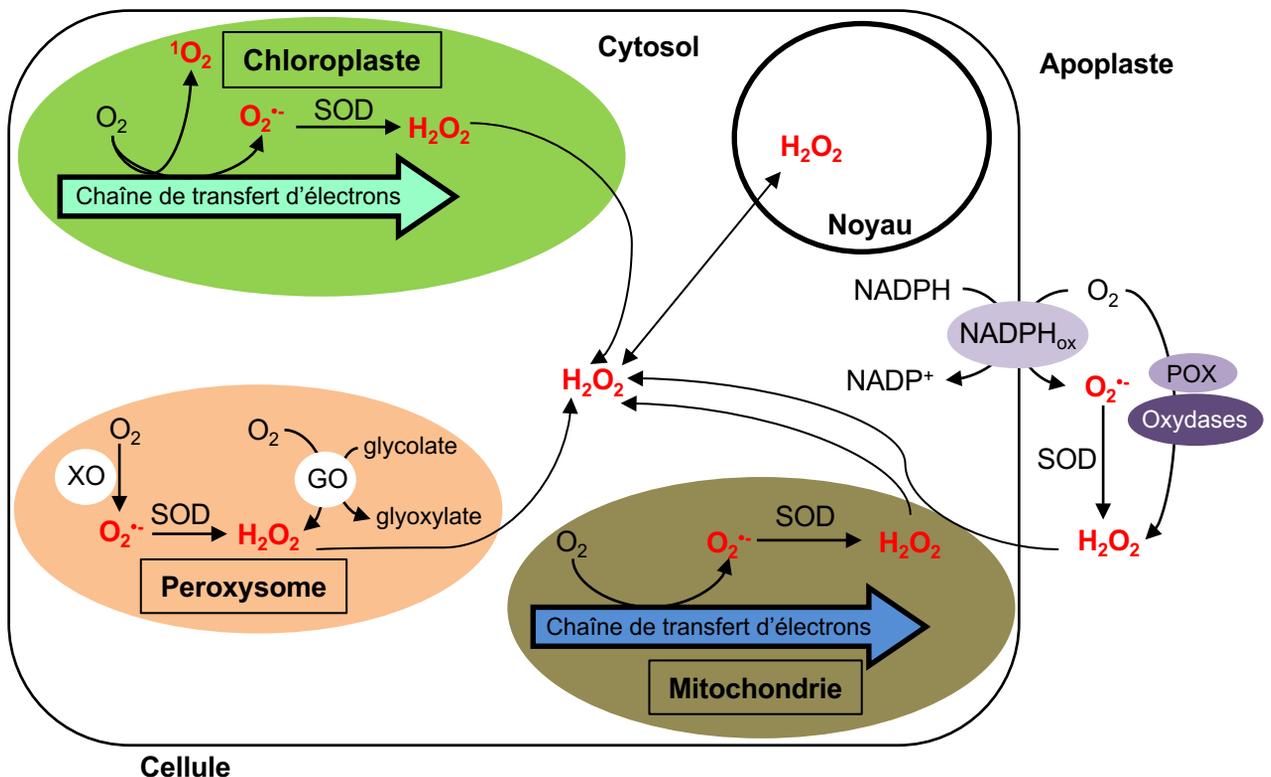


Figure 5 : Principaux sites de production de ROS notamment d' H_2O_2 dans les cellules photosynthétiques.

L' H_2O_2 va principalement être généré au niveau du chloroplaste, de la mitochondrie, du peroxysome et de la membrane. Une fois produit, ce dernier va diffuser dans la cellule. **GO** : glycolate oxydase ; **POX** : peroxydase ; **SOD** : superoxyde dismutase ; **XO** : xanthine oxydase. Modifiée de Mhamdi et al., 2010

II. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) :

II.1 Généralités :

L'homéostasie est la maintenance d'un environnement interne constant en dépit des changements externes environnementaux (stress abiotiques) ou des attaques de pathogènes (stress biotiques). Les plantes sont constamment soumises à des changements dans leur environnement, les amenant à modifier leur métabolisme afin de maintenir un équilibre stable entre la production d'énergie et sa consommation. Cet équilibre dépend largement d'un réseau de signalisation qui coordonne trois des processus les plus critiques dans la vie des plantes : la photosynthèse, la respiration et la photorespiration. Ces activités sont liées au transfert d'électrons, à des substrats, des réducteurs et de l'énergie (Noctor et al., 2007; Foyer and Noctor, 2009; Pfannschmidt et al., 2009).

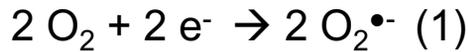
L'apparition de conditions aérobies a donné aux organismes la possibilité d'utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons leur permettant d'exploiter ses propriétés réactives pour le métabolisme et la signalisation (Schippers et al., 2012). L'utilisation de l'énergie favorable au métabolisme a ouvert la voie au développement d'organismes multicellulaires complexes (Schippers et al., 2012; Schirromeister et al., 2013). Les organismes aérobies utilisent le dioxygène (O_2) pour leur production d'énergie en tant qu'accepteur final d'électrons lors de la photorespiration cellulaire. Cette réaction qui fait appel à la photosynthèse et à la chaîne mitochondriale de transport d'électrons aboutit à la réduction de l' O_2 en H_2O . La forme de l' O_2 la plus stable est sous forme de triplet, c'est-à-dire que la molécule contient deux électrons non appariés de spins parallèles sur sa couche la plus externe (Halliwell, 2006). Un apport d'énergie comme la lumière provoque le réarrangement de ces électrons qui ont alors des spins antiparallèles ce qui aboutit à deux formes singulets de l' O_2 (la forme $^1\Sigma_g^+$ qui évolue rapidement sous la forme $^1\Delta_g$, la plus commune). Sous ces deux états, 1O_2 augmente fortement son pouvoir oxydatif et peut directement oxyder des protéines, des lipides et de l'ADN (Halliwell, 2006). L' 1O_2 peut être éliminé par quatre réductions mono-électriques qui le convertissent en anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en radical hydroxyle (HO^{\bullet}/HO^-), puis en eau (H_2O) (Figure 4 et 5) (Mittler et al., 2011; Waszczak et al., 2018). Ces molécules sont nommées les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Certains ROS peuvent être réduits par des enzymes anti-oxydantes. L' $O_2^{\bullet-}$ peut être réduit en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD) (Figure 5) et l' H_2O_2 par les peroxyrédoxines (PRX), les ascorbates peroxydases (APX) et les catalases (CAT) (décrit dans le IV. 1. 2.) (Noctor et al., 2017; Waszczak et al., 2018). En complément, les processus photorespiratoires génèrent des ROS dans les peroxysomes (Figure 5)

(Mittler et al., 2011; Noctor et al., 2017; Waszczak et al., 2018). De plus, la production de ROS extracellulaire dans l'apoplaste implique des enzymes comme les peroxydases apoplastiques, les polyamines oxydases et les NADPH oxydases de la membrane plasmique (Figure 5).

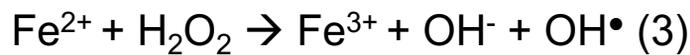
Les ROS sont définis comme des molécules présentant une réactivité chimique supérieure à celle de l'O₂ (Noctor et al., 2017; Waszczak et al., 2018). En fonction de leur concentration dans la cellule, les ROS peuvent donc être soit bénéfiques, soit nuisibles. L'état d'oxydation de la cellule eucaryote végétale est différent dans chaque compartiment. Le réticulum endoplasmique, l'espace intermembranaire de la mitochondrie et le lumen des thylacoïdes sont des compartiments oxydants alors que le cytosol et le stroma des chloroplastes sont des milieux réducteurs (Meyer et al., 2007; Schwarzländer et al., 2008). Concernant l'aspect bénéfique des ROS, il est largement reconnu que la régulation redox impliquant les ROS est un facteur clé modulant les activités cellulaires (Allen and Tresini, 2000; Dat et al., 2000). En effet, lorsque la production de ROS est contrôlée, ceux-ci agissent comme messagers secondaires, aux côtés d'autres médiateurs comme le calcium, non seulement dans les réponses des plantes aux pathogènes mais aussi dans la signalisation hormonale et la réponse à des stress abiotiques comme le stress thermique (Pei et al., 2000; Mittler et al., 2012; Schmidt and Schippers, 2015; Jacob et al., 2017). Les ROS peuvent déclencher la mort cellulaire programmée (MCP), lors du développement comme la mort cellulaire de la couche aleurone, la sénescence des feuilles et aussi lors de divers stress abiotiques et biotiques (Bethke and Jones, 2001; Apel and Hirt, 2004; de Pinto et al., 2012). L'ensemble des ROS peut activer la MCP. Par exemple, la mort cellulaire associée au stress oxydatif induit par l'¹O₂ chloroplastique est le résultat de l'action de deux protéines, EXECUTER1 et 2 (EX1 et 2) qui vont transmettre le signal au noyau (Lee et al., 2007). Le ROS le plus étudié lors de cette MCP est l'H₂O₂. Concernant l'aspect toxique des ROS, une production incontrôlée comme lors d'un changement brutal de conditions environnementales (ex : stress thermique) va provoquer un stress oxydatif. Ce changement brutal va, par exemple, impacter la chaîne de transport d'électrons (ETC) dans les chloroplastes et les mitochondries et la photorespiration dans les peroxysomes (Noctor and Foyer, 1998; Dat et al., 2000). Ceci va générer des ROS qui peuvent oxyder les composés cellulaires environnants comme l'ADN, les lipides et les protéines et ainsi, perturber l'homéostasie de la cellule.

II.2 Génération de ROS par les organismes photosynthétiques : exemple de la photosynthèse

La source majeure des ROS dans les organismes photosynthétiques supérieurs provient du



réaction de Fenton



réaction d'Haber-Weiss

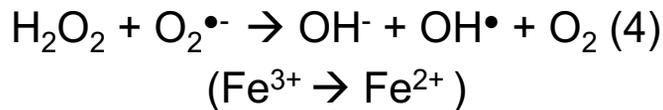


Figure 6 : Production de ROS au cœur de la chaîne photosynthétique.

Les réactions **1** et **2** représentent la photoréduction de l'oxygène en H_2O_2 se déroulant au niveau du PSI. **(1)** L'auto-oxydation de la ferrédoxine réduite catalyse cette réaction. **(2)** la superoxyde dismutase avec l'aide d'un cofacteur métallique de type Cu/ZN catalyse la dismutation de l'anion superoxyde (Asada et al., 1974). En parallèle, l'anion superoxyde peut aussi être créé minoritairement par auto-oxydation au niveau du PSII (Ireland et al., 1985). **(3)** Selon la réaction de Fenton, le peroxyde d'hydrogène réagit avec le fer ferreux (Fe^{2+}) pour former des radicaux hydroxyles ou bien **(4)** avec l'anion superoxyde et le fer ferrique (Fe^{3+}) pour générer ces radicaux et de l' O_2 selon la réaction d'Haber-Weiss.

chloroplaste (Figure 5) (Foyer and Noctor, 2003). La photosynthèse se déroule en deux étapes : une phase photochimique et une phase d'assimilation. Durant la phase photochimique, l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique. Concrètement, les électrons de l'eau sont transférés au NADP^+ (l'accepteur final) *via* l'utilisation de l'énergie lumineuse (photons) collectée dans le photosystème II, ce qui provoque la formation d'oxygène et la libération de protons. Plusieurs intermédiaires entrent en jeu dans ce transfert d'électrons : des plastoquinones, le complexe cytochrome *b6f* et les plastocyanines se trouvant dans le photosystème I. L'énergie qui est également collectée dans ce photosystème permet le transfert du pouvoir réducteur vers les ferrédoxines. La ferrédoxine réduite va être utilisée par le système thiorédoxine (TRX) (décrit dans V. 2.). La ferrédoxine- NADP^+ réductase utilise ces électrons pour réduire le NADP^+ en NADPH. Ce NADPH va également servir de réducteur pour de nombreuses enzymes telles que la NADPH-dépendante glutathion réductase (GR). Ce transfert linéaire d'électrons se déroule en simultané avec le gradient de protons créé lors de la photolyse de l'eau et de l'oxydation des plastoquinols. Ceci va permettre la création d'une force proton-motrice qui est utilisée pour la formation d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi) *via* l'ATP synthase. Par la suite, cette énergie chimique nouvellement produite va être consommée durant la phase d'assimilation pour la production de composés carbonés lors du cycle de Calvin-Benson (Bassham et al., 1950). La réaction de carboxylation qui s'y produit est la fixation du CO_2 atmosphérique sur le ribulose-1,5-biphosphate par la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygénase (RuBisCO), l'enzyme clé de la photosynthèse.

Des variations de l'environnement et l'absorption d'un excès de lumière peuvent perturber l'homéostasie de ce système photosynthétique comme cela a été montré dans plusieurs études et générer une production excessive de ROS principalement au niveau des centres réactionnels des photosystèmes. Par exemple, de fortes températures inactivent de manière irréversible certaines enzymes telles que la RuBisCO (Crafts-Brandner and Salvucci, 2002). Un déficit hydrique peut quant à lui entraîner la fermeture des stomates afin de limiter la perte d'eau ce qui provoque la diminution de la concentration en CO_2 et impacte le cycle de Calvin-Benson (Lawlor, 2002). Comme évoqué précédemment, dans ces conditions, l'oxygène peut devenir instable et être réduit sous différentes formes (Figure 4). L' O_2 peut être photoréduit en H_2O_2 par deux réactions (1) et (2) décrites dans la Figure 6 (se référer également aux Figures 4 et 5) (Asada et al., 1974; Ireland et al., 1985). L' H_2O_2 peut réagir avec du fer ferreux Fe^{2+} (réaction de Fenton) ou avec l'anion superoxyde et le fer ferrique Fe^{3+} (réaction d'Haber-Weiss) pour former des radicaux hydroxyles.

II.3 Les ROS et la croissance de la plante :

La production dirigée de ROS est cruciale pour plusieurs événements du développement chez les plantes (Suzuki et al., 2011; Consideine and Foyer, 2014). Des études soutiennent que les ROS peuvent agir en tant que molécules signal, un rôle fonctionnel similaire aux hormones (Schmidt and Schippers, 2015). Comme vu précédemment, la MCP contrôlée par les ROS se produit pendant les processus du développement (Bethke and Jones, 2001; Apel and Hirt, 2004; Gechev et al., 2005). Les ROS conduisent aussi à l'inhibition de la croissance et du développement des plantes (Gill and Tuteja, 2010). Il a été montré que le traitement exogène à l' H_2O_2 réprime l'expression des gènes liés au cycle cellulaire et réduit la taille du méristème racinaire (Tsukagoshi, 2012). Les dommages causés à l'ADN arrêtent la prolifération cellulaire (Tanaka et al., 2006; Roldan-Arjona and Ariza, 2009). L' H_2O_2 affecte également la prolifération du cortex (Cui et al., 2014). De plus, les ROS sont critiques pour l'élongation et l'expansion des racines mais également dans la différenciation des poils absorbants (Foreman et al., 2003; Sundaravelpandian et al., 2013). Enfin, les ROS sont importants dans la prolifération et la différenciation cellulaire dans les racines (Tsukagoshi, 2016). Les ROS agissent également avec les phytohormones. Par exemple, l'accumulation d'auxine augmente les ROS notamment l' H_2O_2 dans la plupart des types cellulaires (Joo et al., 2001). Ce phénomène est observé pour le gravitropisme où un flux asymétrique d'auxine et la production de ROS sont déclenchés à la pointe de la racine.

Le contrôle de la quantité de ROS et de leurs dommages est donc un aspect important de la croissance des plantes. La balance rédox doit alors être ajustée dans ces voies. Ce contrôle est réalisé par la détoxification des ROS *via* les molécules et les enzymes anti-oxydantes et par les systèmes de réduction comme les thiorédoxines (TRX) et les glutarédoxines (GRX) (Rouhier et al., 2015; Noctor et al., 2017). Ces aspects sont décrits dans les parties **IV.** et **V. 3. 2.** où dans ce dernier les rôles de certaines GRX dans le développement des plantes sont présentés. Le niveau de ROS intracellulaire doit être contrôlé dans d'autres contextes comme lors de stress environnementaux qui, comme nous l'avons vu précédemment, peuvent perturber cet équilibre redox et provoquer les dommages associés à la production excessive de ROS (Jaspers and Kangasjärvi, 2010; Suzuki et al., 2012).

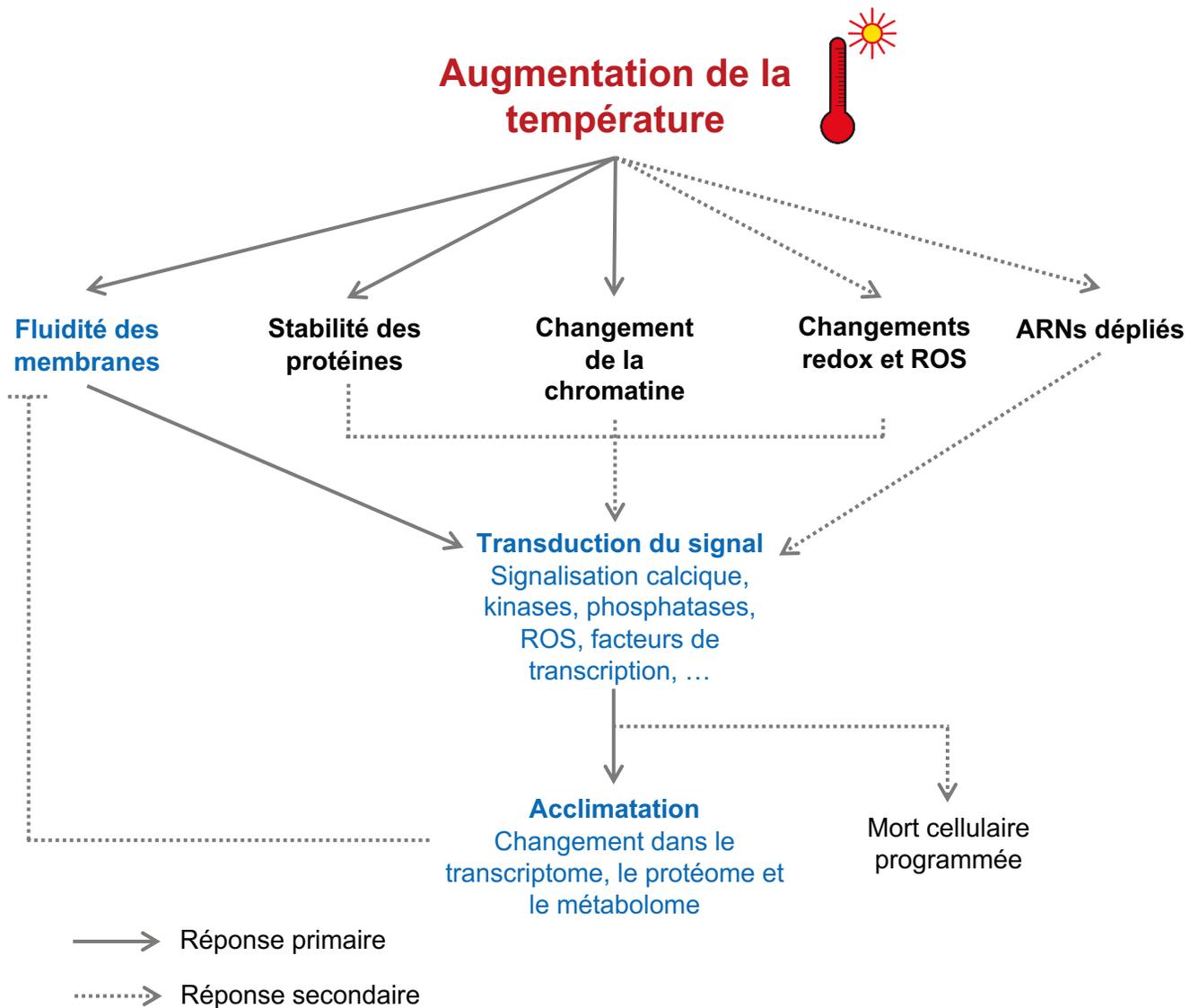


Figure 7 : Modèle schématique de la perception, la réponse et l'acclimation à une augmentation de la température chez les plantes.

L'augmentation de la température affecte de nombreux processus. De légers changements de température peuvent altérer les propriétés de la membrane et activer un canal calcique. Le flux entrant de calcium qui suit activerait les événements de transduction du signal et modifierait le métabolisme de la plante dans un processus appelé acclimation. Cette voie (en bleu et liée par des flèches pleines) peut servir de mécanisme primaire de détection de la chaleur chez les plantes. Les changements supplémentaires induits par la température incluent des altérations de la stabilité protéique et de l'exposition des résidus hydrophobes des protéines, déplacement des histones dans le noyau, l'accumulation de ROS, l'altération des niveaux d'énergie cellulaire et le dépliement d'ARN qui pourraient agir comme des « ribo-switches » ou affecter la fonction des spliceosomes et des microARN. Ces voies (indiquées en noir) déclenchent différents événements de transduction du signal et contribuent à l'acclimation de la plante. Une alternative à l'acclimation est l'activation de la mort cellulaire programmée qui pourrait être déclenchée sur la base d'une compilation de différentes voies et conditions de transduction du signal. Adaptée de Mittler et al., 2012.

III. Les plantes face aux stress environnementaux : l'exemple du stress thermique

La plante fait fréquemment face à différents stress biotiques ou abiotiques qui peuvent perturber son homéostasie cellulaire et impacter sa croissance et son développement (Boyer, 1982). Les stress biotiques se traduisent par l'attaque d'un pathogène tels que les virus, les bactéries ou les champignons. Les stress abiotiques peuvent être de différente nature tels que l'excès de sel, la sécheresse, le manque ou l'excès de lumière, les carences et les excès des micro/macroéléments et les changements de température. Les plantes, comme les autres organismes vivants, répondent à ces contraintes en mettant en place de nombreux mécanismes d'adaptation. Ces changements majeurs impliquent la reprogrammation de l'expression génique, la modification du protéome et du métabolome.

Le stress thermique peut affecter de nombreux éléments de la cellule : la stabilité des membranes, des ARN et des protéines, l'homéostasie redox, la structure du cytosquelette, la traduction, dégradation des protéines et l'efficacité des réactions enzymatiques (Figure 7) (McClung and Davis, 2010; Ruelland and Zachowski, 2010; Suzuki et al., 2012; Mittler et al., 2012). La température peut dans des conditions extrêmes déclencher la mort cellulaire due à de trop nombreuses protéines dénaturées, agrégées et la perte de l'intégrité membranaire (Wahid et al., 2007). La signalisation calcique, les kinases, les phosphatases, les facteurs de transcription et les ROS permettent la transduction du signal afin d'enclencher un mécanisme de réponse (Figure 7) (Mittler et al., 2012). Celle-ci entraîne une réorientation de la machinerie transcriptionnelle vers l'induction des protéines de choc thermique (HSP), la synthèse de phytohormones et l'adaptation du métabolisme des sucres, des lipides, de l'ARN, de la traduction et enfin des métabolites primaires et secondaires (Rizhsky et al., 2004).

III.1 La perception du stress thermique et la transduction du signal : rôle des membranes plasmiques, du calcium, des protéines kinases, des HSF et des ROS

Des études chez la mousse *Physcomitrella patens* et chez *Arabidopsis thaliana* montrent que les premiers événements de perception du stress thermique se passeraient au niveau de la membrane plasmique (MP) (Figure 8) (Saidi et al., 2009, 2010; Niu and Xiang, 2018). Ces études ont été menées sur plusieurs traitements thermiques différents (généralement 30°C-40°C) et de différentes durées (de quelques minutes à plusieurs heures). L'augmentation de la température est perçue au niveau de la

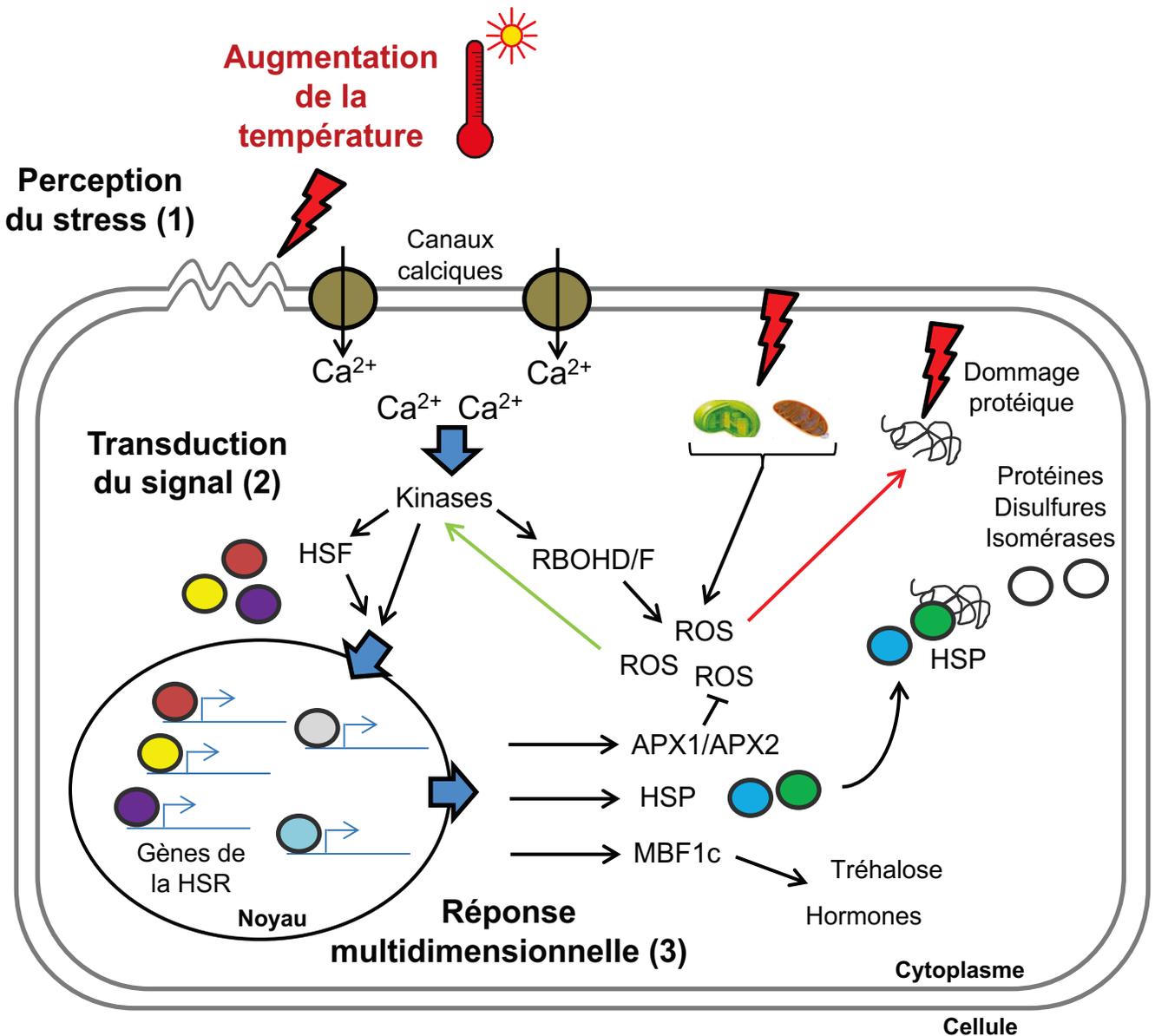


Figure 8 : La perception, la transduction du signal et la réponse au stress thermique.

(1) La perception du stress se ferait au niveau de la membrane plasmique (MP). La fluidité de la MP va changer et cela entrainerait un influx de Ca^{2+} dans la cellule. (2) Ce Ca^{2+} intracellulaire activerait différentes kinases qui vont activer plusieurs éléments comme des facteurs de transcription (FT) tels que des HSF, WRKY et ZAT qui vont induire la réponse et des RBOH qui vont amplifier le signal ROS. (3) La réponse au stress thermique est multidimensionnelle, la cellule va changer son transcriptome, son protéome et son métabolome. Les éléments majeurs de cette réponse sont les enzymes anti-oxydantes telles que les APX afin de détoxifier les ROS, les protéines chaperonnes comme les HSP pour protéger les protéines de la dénaturation et enfin le co-activateur MBF1c impliqué dans la voie du tréhalose, de l'acide salicylique et de l'éthylène.

MP par une modification de la fluidité membranaire, ce qui induit l'activation des canaux calciques. L'influx de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire active la réponse au stress thermique (HSR) (Figures 7 et 8). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* code 40 canaux calciques qui pourraient potentiellement se localiser au niveau de la MP et servir de senseurs du stress thermique (Ward et al., 2009). La suppression de la voie HSR dans les plantes supérieures par les inhibiteurs et chélateurs des canaux calciques confirment le rôle essentiel de la signalisation calcique à partir de la MP dans la perception du stress thermique (Busch et al., 2005). Ce signal calcique va activer la voie des kinases afin d'induire les facteurs du choc thermique (HSF) d'une part et la production de ROS d'autre part (Figure 8). Enfin, il a été montré que certaines HSF, comme HSFA1a, vont former des homotrimères *via* les ROS lors d'un stress thermique et être relocalisées du cytoplasme au noyau pour y induire des gènes de réponses au stress thermique (Zou et al., 1998; Volkov et al., 2006).

III.1.1 Présentation des facteurs du choc thermique (HSF) :

Chez *Arabidopsis thaliana*, 21 HSF ont été identifiées (Nover et al., 2001; von Koskull-Döring et al., 2007). Elles peuvent être classées à partir des caractéristiques structurales de leurs domaines en trois groupes : A, B et C (Nover et al., 2001; Baniwal et al., 2004; Guo et al., 2016). Il y a très peu d'études sur les HSF de classes B et C chez la plante. Néanmoins, les membres de la classe B sont absolument nécessaires à la plante pour la résistance au stress thermique. Chez *Arabidopsis thaliana*, HSFB1 et HSFB2b répriment l'induction des HSP pendant la période de récupération du stress thermique (lorsque ce dernier est fini) (Ikeda et al., 2011). Les HSF de classe A, notamment HSFA1a, b, d et e, ont été identifiées comme étant des acteurs de l'activation de la HSR (Yoshida et al., 2011). Ces facteurs de transcription se lient spécifiquement aux HSE (éléments de stress thermique) des gènes cibles afin de les activer (Liu et al., 2011). En effet, le double mutant perte de fonction (KO), *hsfa1a/b*, est incapable de former des complexes de liaison avec le domaine HSE et l'accumulation d'ARNm des gènes cibles est significativement altérée lors du stress thermique (Lohmann et al., 2004).

III.1.2 La production de ROS lors du stress thermique :

De nombreuses études montrent que les différentes contraintes environnementales dont la haute température induisent un stress oxydatif chez les plantes (Dat et al., 1998; Volkov et al., 2006; Suzuki et al., 2012; Mittler et al., 2012; Hasanuzzaman et al., 2013; Jacob et al., 2017). Les ROS qui sont, comme vu précédemment, des sous-produits du métabolisme aérobie, s'accumulent dans les cellules au cours de stress abiotiques comme de fortes températures (Figures 7 et 8)

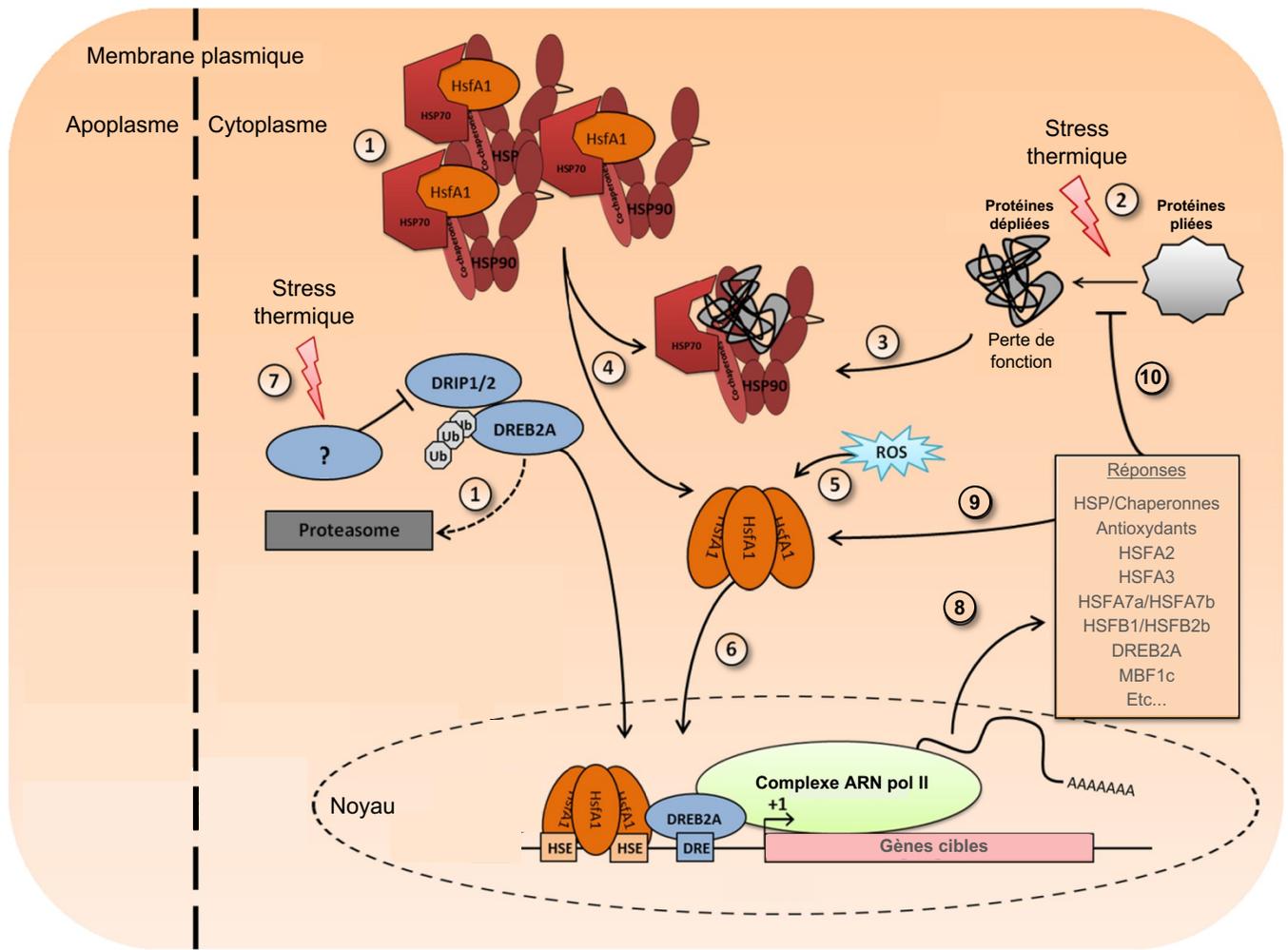


Figure 9 : Représentation schématique de la voie HSF/HSP.

(1) En l'absence de stress, les HSF de classe A1 sont séquestrées par HSP90/70 et leurs cochaperonnes. Les protéines DREB2A sont dégradées grâce aux E3 ligases DRIP1/2 (Qin et al., 2008). Lors du stress thermique (2), le nombre élevé de protéines mal repliées déclenche le recrutement de HSP90/70 et libère les HsfA1 (4). Dans un contexte de ROS élevé (5), les HsfA1 peuvent former des oligomères et sont envoyés dans le noyau (6) pour se lier à HSE sur l'ADN et induire la transcription des gènes cibles. Le stress dû à la chaleur conduit à une inhibition de DRIP1/2 et à une accumulation de DREB2A (7). DREB2A peut ensuite pénétrer dans le noyau et se lier au motif DRE pour activer l'expression des gènes cibles (8). Les protéines induites comprennent des FT qui réagissent positivement sur la transcription des HSF, des HSP (9) ou des protéines qui participent au rétablissement de l'homéostasie (10). Après le stress, le contenu HSF/HSP de la cellule est différent par rapport à l'avant stress. La quantité et la nature des HSF/HSPs définissent l'état acclimaté. Modifiée de Jacob et al., 2017.

(Miller et al., 2008; Jaspers and Kangasjärvi, 2010). En effet, pendant le stress thermique, les niveaux de ROS augmentent considérablement, entraînant des dommages importants aux macromolécules végétales et aux structures cellulaires (Gill and Tuteja, 2010). Les ROS sont produites de deux façons différentes lors d'un stress thermique : par des NADPH oxydases de type RBOH ou dans les organites tels que le chloroplaste ou la mitochondrie, où la production de ROS nécessaire à leur fonctionnement augmente fortement (Figure 5). Une des espèces réactives de l'oxygène générée lors d'un stress thermique est l' H_2O_2 . En effet, des stress thermiques courts peuvent entraîner des augmentations très rapides de peroxyde d'hydrogène (Mittler, 2002; Volkov et al., 2006; Baxter et al., 2014). Des études suggèrent que l'AtHSFA4a et l'AtHSFA8, répondant aux changements redox, pourraient agir comme des senseurs de ROS (Qu et al., 2013). Ces facteurs de transcription présents dans la cellule seraient capables de détecter les ROS comme l' H_2O_2 produit lors du stress thermique (Volkov et al., 2006; Miller and Mittler, 2006; Miller et al., 2008). Ils pourraient enclencher la voie MAPK afin d'induire des NADPH oxydases telles que RBOHD et F. Ces NADPH oxydases vont donc faire augmenter la quantité de ROS intracellulaire.

III.1.3 Le rôle des HSF et des ROS dans l'induction de la réponse au stress thermique (HSR) :

Les HSF, notamment les HSF de classe A et les ROS sont impliqués dans l'induction de la réponse au stress thermique (Figures 7 et 8). En absence de stress, les HSF de classe A1 sont séquestrées par HSP90/70 et leurs co-chaperonnes (Figure 9) (Zou et al., 1998; Jacob et al., 2017). Les protéines DRE-BINDING PROTEIN 2A (DREB2A) sont dégradées grâce aux E3 ligases DRIP1/2 (Qin et al., 2008). Le stress thermique conduit à l'inhibition de DRIP1/2 et à une accumulation de DREB2A, qui peut se lier au motif DRE dans le noyau pour activer l'expression des gènes cibles (Figure 9). Lors de ce stress, le nombre élevé de protéines mal repliées déclenche le recrutement de HSP70 et de HSP90 et libère les HSFA1 (Jacob et al., 2017). Dans un contexte de ROS élevées, les protéines HSFA1 peuvent former des oligomères et sont envoyées dans le noyau pour se lier au motif HSE sur l'ADN et induire la transcription des gènes cibles (Barros et al., 1992). En effet, il a été montré que l' H_2O_2 était capable d'induire la trimérisation d' HSFA1a et la liaison des trimères sur les HSE (Volkov et al., 2006; Liu et al., 2013b). Certaines HSF sont phosphorylées par des MAPK lors du stress thermique. Par exemple, HSFA2 est phosphorylée par la MAPK6 sur sa T249 ce qui va permettre sa relocalisation (Evrard et al., 2013). Les MAPK3 et 6 phosphorylent HSFA4 sur sa S309 et pour lui permettre d'activer la transcription d'HSP17.6 (Perez-Salamo et al., 2014). Ces deux MAPK vont être activées par l' H_2O_2 (Kovtun et al., 2000; Mittler et al., 2012; Qu et al., 2013). L' H_2O_2

est donc un composé essentiel dans l'expression des gènes induits lors de stress thermiques notamment les HSP (Jacob et al., 2017). Par exemple, chez la tomate et le riz, l'HSP22 mitochondriale et l'HSP26 chloroplastique, sont induites par l'H₂O₂ (Banzet et al., 1998; Lee et al., 2000). Chez les cyanobactéries et *Arabidopsis thaliana*, la forte lumière et l'H₂O₂ respectivement, induisent les ARNm de certaines HSP et HSF (Hihara et al., 2001; Desikan et al., 2001). Enfin, les AtHSP17.6 et AtHSP18.6 ont des niveaux d'expression comparables suite à un traitement thermique ou un traitement à l'H₂O₂ (Volkov et al., 2006).

III.2 L'induction des gènes de réponse au stress thermique (HSR) :

Les gènes de la HSR vont être activés afin de répondre au stress thermique. La réponse est composée de FT et de protéines qui participent au rétablissement de l'homéostasie et d'HSP (Figures 8 et 9). Premièrement, l'expression des facteurs de transcription de type ZAT, ZAT10 et 12 est activée. Ils vont induire la production d'enzymes anti-oxydantes, APX1 et APX2, afin de réguler la quantité intracellulaire de ROS (Figure 8) (Sangwan et al., 2002; Suzuki et al., 2011; Miller et al., 2008). Il a été suggéré que l'AtHSFA4a et l'AtHSFA8 pourraient être les activateurs de cette voie. Ces HSF pourraient aussi induire le facteur de pontage multi-protéique 1c (MBF1c). Ce dernier est impliqué dans la voie du tréhalose, un sucre composé de deux glucoses et des phytohormones (Mittler et al., 2012). D'autres enzymes anti-oxydantes comme la catalase (CAT) et de la superoxyde dismutase (SOD) vont également être induites (Driedonks et al., 2015).

Dans toutes les espèces étudiées, le stress thermique entraîne la production de protéines de choc thermique (HSP). Cette production est contrôlée par toute la chaîne de perception décrite plus haut (Figures 7, 8 et 9) (Jacob et al., 2017). Les HSP ont un rôle clé dans la réponse et la résistance au stress thermique. Les plantes sont uniques dans le nombre et la complexité des HSP qu'elles produisent lors du stress (Jakob and Buchner, 1994; Schöffl et al., 1998). Elles sont classées en plusieurs familles en fonction de leur poids moléculaire : HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 et les petites HSP. Les mutants de certaines d'entre elles tels que *hsp70*, *hsp90* et *hsp101* affichent une survie réduite en réponse au stress thermique ce qui démontre leur importance dans cette réponse (Su and Li, 2008; Yamada et al., 2007; Queitsch et al., 2000). Elles présentent une fonction de chaperonne en conditions de stress thermique mais également en conditions normales (Jaenicke and Creighton, 1993; Boston et al., 1996; Jacob et al., 2017). Une partie d'entre elles sont donc produites de manière constitutive à température normale, d'autres induites lors de stades développementaux particuliers et enfin certaines seulement en réponse au stress thermique. En conditions normales, elles contrôlent la

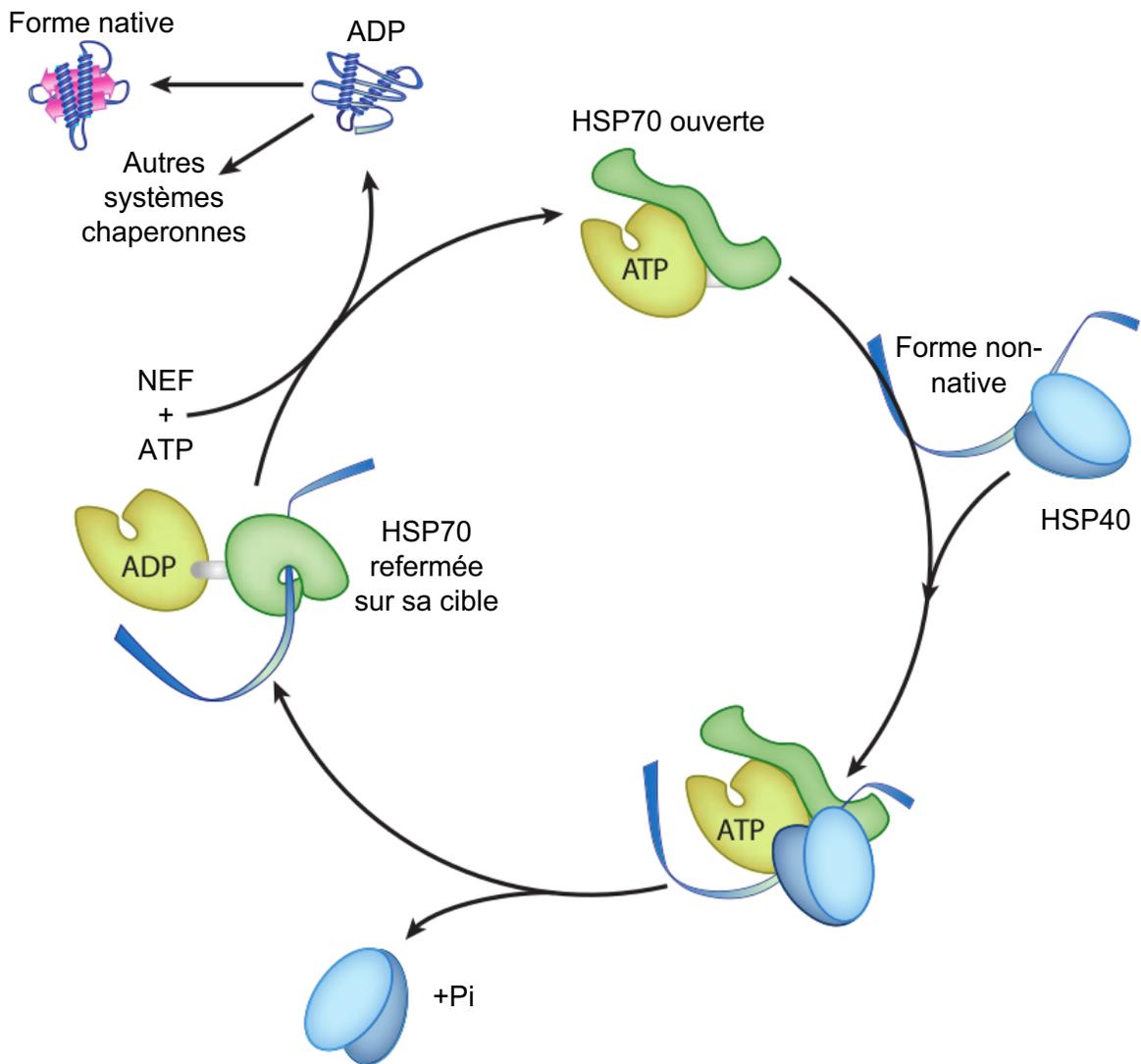


Figure 10 : Activité foldase : exemple du cycle de réaction ATP-dépendant de l'HSP70.

En absence de substrat sous forme non-native, l'HSP70 est maintenue en état ouvert par l'ATP et la NBD. Cet état facilite la liaison de l'HSP70 à un substrat apporté par la co-chaperonne HSP40. L'hydrolyse de l'ATP en ADP catalyse la fermeture de l'HSP70 sur sa cible. L'aide d'une seconde co-chaperonne NEF permet la libération de l'ADP et l'utilisation d'un second ATP. Ceci va permettre au substrat d'adopter une forme native. Modifiée de Kim et al. 2013.

signalisation cellulaire, le repliement des protéines, la translocation et la dégradation, mais elles peuvent aussi être co-chaperonnes dans le transfert des coeurs [Fe-S] (se référer au V.3.3.2) (Boston et al., 1996; Dutkiewicz and Nowak, 2018). En conditions de stress thermique, elles empêchent les repliements anormaux et l'agrégation des protéines et peuvent protéger les membranes. En plus des chaperonnes moléculaires, les peptidyl-prolyl isomérases ou les protéines disulfures isomérases (PDI) jouent le rôle de catalyseur de repliement direct afin de rendre la conformation native aux protéines dépliées (Figure 8) (He et al., 2004; Tu and Weissman, 2004). Enfin, plusieurs protéases sont également induites dans des conditions de choc thermique pour dégrader les protéines mal repliées. Elles sont donc indirectement impliquées dans la gestion de l'agrégation des protéines.

III.3 Les protéines chaperonnes : fonctions et familles

III.3.1 Le rôle des protéines chaperonnes :

La fonction de chaperonne intervient dans de nombreux processus cellulaires en condition de stress mais également en conditions optimales de croissance et ceci a été montré dans tous les règnes (Ellis and Hartl, 1999; Hartl and Hayer-Hartl, 2002). En effet, une protéine est capable d'adopter différentes conformations selon son environnement cellulaire. Sa conformation est déterminée par plusieurs paramètres : sa séquence intrinsèque d'acides aminés et les interactions avec d'autres protéines (Balchin et al., 2016; Chiti and Dobson, 2017). Ceci intègre les interactions avec les partenaires protéiques d'oligomérisation et les chaperonnes moléculaires qui sont les guides de la conformation vers un état natif. Les régions hydrophobes d'une protéine sont sujettes à l'agrégation. Un défaut de repliement, des mutations ou encore des stress comme le stress thermique provoquent un mauvais repliement. Ce défaut de repliement peut exposer des régions interactives, rendant les protéines vulnérables et pouvant entraîner leur agrégation (Bukau and Horwich, 1998; Walter and Buchner, 2002; Mogk et al., 2018). Il existe deux grands mécanismes distincts chez les chaperonnes qui permettent d'une part de replier correctement une protéine partiellement dépliée, c'est la fonction foldase, et d'autre part d'empêcher une protéine d'évoluer vers un stade agrégat en la maintenant dans un stade partiellement déplié jusqu'à l'arrêt de la condition défavorable, c'est la fonction holdase.

III.3.2 Les différents types de chaperonnes :

Les protéines chaperonnes présentent généralement un seul type d'activité : l'activité foldase ou l'activité holdase. Mais plus récemment, des études ont mis en évidence, des protéines possédant de

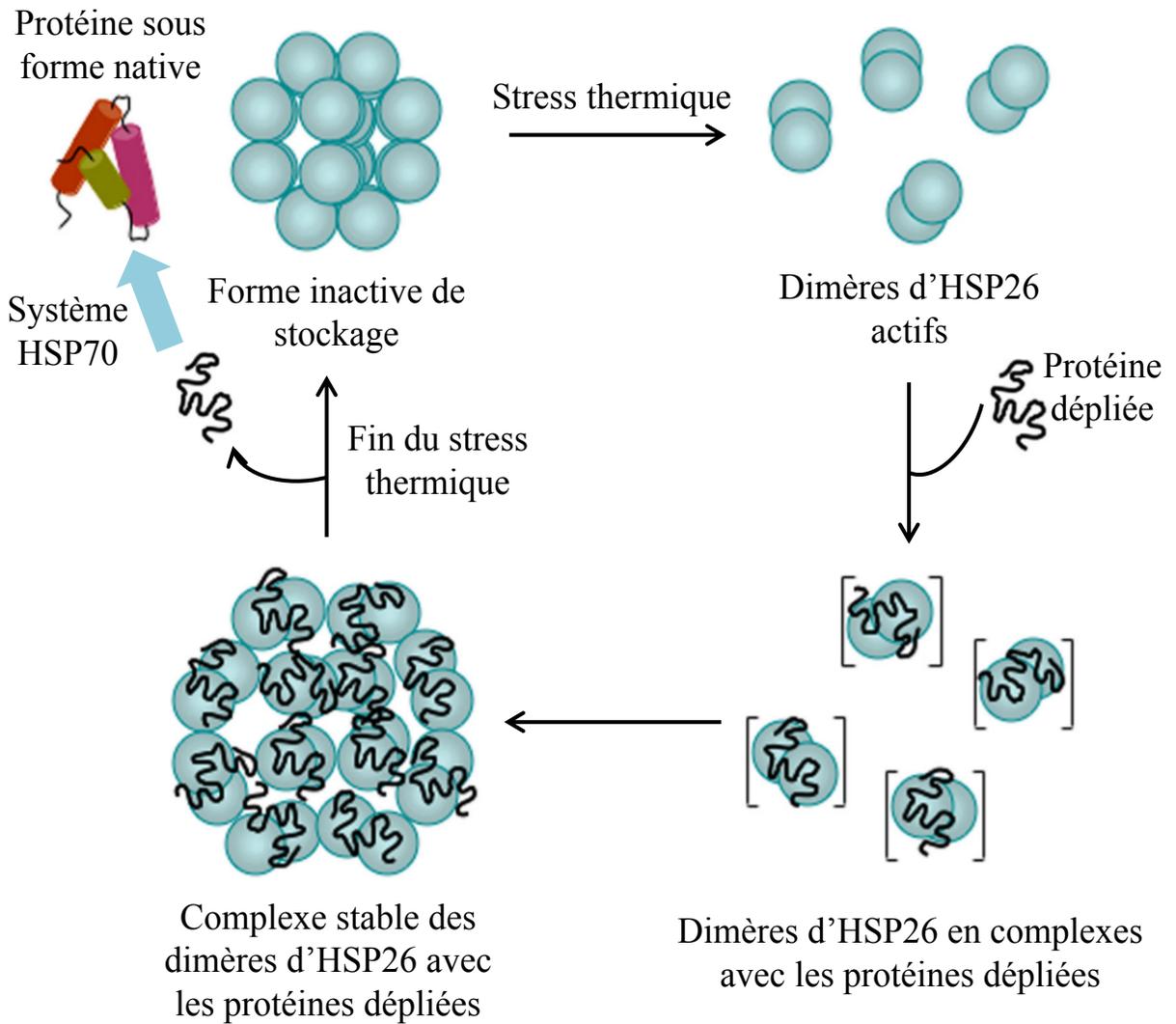


Figure 11 : Activité holdase indépendante de l'ATP : exemple de la petite HSP26.

Lors de conditions normales, l'HSP26 est stockée sous forme d'un complexe composé de dimères. Durant un stress thermique, les dimères d'HSP26 sont libérés et vont se lier à des protéines dépliées et former à nouveau un complexe dans le but de les protéger. Une fois le stress terminé, le complexe va confier ces protéines dépliées au système foldase HSP70 pour leur permettre de retrouver une conformation native avant de retrouver une forme complexée de stockage. Modifiée de Winter and Jacob. 2004.

façon concomitante les deux activités. De plus, certaines protéines présentent une activité chaperonne en plus de leur activité principale, ce qui complexifie la classification des chaperonnes.

III.3.2.1 Les foldases :

L'activité foldase concerne le repliement des protéines partiellement dépliées. Les foldases de type HSP ou petite HSP ne possèdent que cette activité et elles sont généralement dépendantes de l'hydrolyse d'ATP en ADP pour effectuer le repliement de leurs protéines cibles (Wegele et al., 2004). Les foldases varient entre un état lié à l'ATP ou à l'ADP, et conditionne l'affinité des foldases pour leur cible. Par exemple, HSP70 a besoin de ce cycle ATP/ADP et de deux co-chaperonnes HSP40 et NEF pour accomplir son activité foldase (Figure 10) (Kim et al., 2013b). HSP70 est d'abord liée à l'ATP où elle est ouverte et a une faible affinité envers les protéines mal repliées. La co-chaperonne HSP40 liée à une protéine mal repliée, interagit avec le complexe HSP70/ATP et provoque l'hydrolyse de l'ATP en ADP et la fermeture de l'HSP70 sur la protéine mal repliée. L'aide de la co-chaperonne NEF et l'ajout d'ATP permet le repliement de cette protéine et sa libération par l'ouverture d'HSP70 qui perd à nouveau son affinité pour les substrats.

III.3.2.2 Les holdases :

L'activité holdase consiste à protéger les protéines dépliées contre la formation d'agrégats (Haslbeck, 2002; Hoffmann et al., 2004; Stromer et al., 2004). Il a été montré que certaines holdases présentaient et transféraient leurs substrats à des foldases, telle que DnaK (HSP70), pour prendre alors en charge le repliement des protéines lorsque les conditions redeviennent normales (Lee and Vierling, 2000; Mogk et al., 2003a, 2003b; Hoffmann et al., 2004). Par exemple, HSP33 et d'autres petites HSP se lient à leur substrat par des régions hydrophobes devenues exposées dans des conditions défavorables (Jakob et al., 1993; Lee et al., 1997; Graf et al., 2004). Ces protéines sont généralement ATP-indépendantes (Tapley et al., 2010; Hoffmann et al., 2010; Dahl et al., 2015). L'HSP26 est un bon exemple de protéine chaperonne active lors d'un stress thermique. En conditions normales, elle est composée de 24 sous-unités (Figure 11) (Bentley et al., 1992; Haslbeck et al., 1999). En condition de stress thermique, ce complexe se dissocie et l'HSP26 se retrouve sous forme de dimère. Ce dimère va s'associer à des protéines dépliées afin de les préserver de l'agrégation. Les complexes nouvellement formés se lient entre eux afin de former un gros complexe stable de 24 sous-unités contenant les protéines dépliées dans chaque dimère. Dans des conditions de températures plus favorables, le complexe va transférer ses protéines dépliées à des protéines foldases telles que HSP70

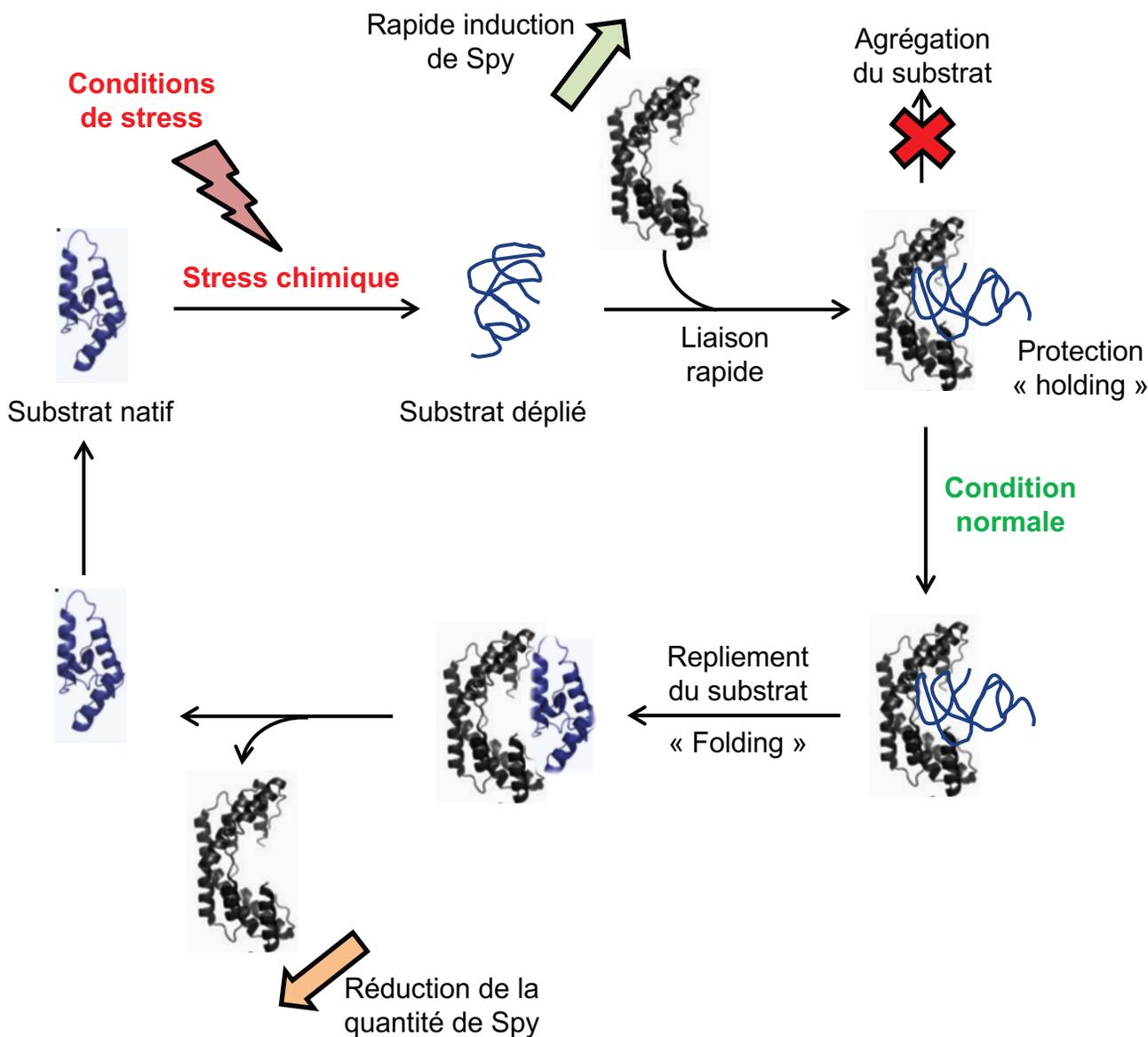


Figure 12 : Protéine chaperonne à double activité foldase et holdase : l'exemple de la protéine Spy d'*E. coli*.

Des conditions de stress chimique peuvent dénaturer les protéines. Spy est une protéine chaperonne bactérienne très rapidement induite en grande quantité lors d'un stress tel que l'exposition au butanol et aux tanins. Elle va se lier aux protéines dépliées pour les protéger lors du stress et empêcher leur agrégation. Une fois les conditions normales revenues, Spy va replier le substrat afin de rendre une conformation native. Par la même occasion la quantité de Spy dans la cellule va diminuer. Adaptée de Stull *et al.* 2016.

et permettre de rétablir une conformation native. Le complexe va redevenir inactif et rester sous sa forme de 24 sous-unités en attendant un nouveau stress thermique.

III.3.2.3 Les protéines présentant les deux fonctions : holdase et foldase

III.3.2.3.1 Protéine chaperonne pour seule activité : le cas de Spy chez *E. Coli*

La protéine α -hélicoïdale dimérique en forme de berceau Spy chez *E. Coli* présente ces deux activités chaperonnes indépendamment de l'ATP. Elle empêche la formation d'agrégats en repliant les protéines dépliées. (Quan et al., 2011, 2014). Elle est fortement exprimée lors de contraintes telles que l'exposition au butanol ou aux tanins (Quan et al., 2011; Brynildsen and Liao, 2009; Rutherford et al., 2010). Les fonctions chaperonnes de Spy ont été découvertes grâce à son affinité pour Im7 (Ferguson et al., 1999; Capaldi et al., 2001, 2002; Friel et al., 2003; Knowling et al., 2009; Friel et al., 2009). Spy a une forte affinité pour Im7 dans ses 3 états de conformation : dépliée, partiellement repliée et native ce qui favorise sa renaturation et empêche son agrégation sans avoir besoin de fournir de l'énergie sous forme d'ATP (Stull et al., 2016). Ces auteurs ont proposé un mécanisme montrant comment Spy inhibe l'agrégation de protéines et assiste au repliement des protéines vers une conformation native (Figure 12). Lors de stress chimiques tels que le butanol ou les tanins, la protéine Spy est induite très fortement (Quan et al., 2011; Brynildsen and Liao, 2009; Rutherford et al., 2010). Elle s'associe alors rapidement (à l'échelle de la milliseconde) aux protéines partiellement ou totalement dépliées par le stress ce qui empêche leur agrégation. Une fois le stress fini, le repliement des substrats de Spy devient énergiquement favorable, les protéines retrouvent donc une conformation native.

III.3.2.3.2 Protéines présentant une double activité chaperonne en plus d'une autre fonction enzymatique :

Ces dernières années, des études ont montré des activités foldases et/ou holdases par des protéines n'appartenant pas à la famille des HSP. La majorité de ces protéines sont issues de la grande famille des protéines anti-oxydantes et ces activités chaperonnes s'ajoutent à leur fonction principale. C'est par exemple le cas de la chaperédoxine CnoX d'*Escherichia Coli*, les 2-cys-peroxyrédoxines (2-Cys Per), des protéines disulfides isoméras (PDI), la thiorédoxine TRXh3 (présentant seulement une activité holdase), la thiorédoxine réductase de type C d'*Arabidopsis thaliana* (AtNTRC), la thiorédoxine-like disulfide réductase (AtTDX) et l'ascorbate peroxydase osAPX2 de riz (Goemans et al., 2018; Kumsta and Jakob, 2009; Conway and Lee, 2015; Park et al., 2009a; Chae et al., 2013; Lee et al., 2009; Hong et al., 2018). Par exemple, la chaperédoxine CnoX, inactive en conditions normales, est activée en tant qu'holdase par l'eau de javel (HOCl) qui va chlorer plusieurs résidus de

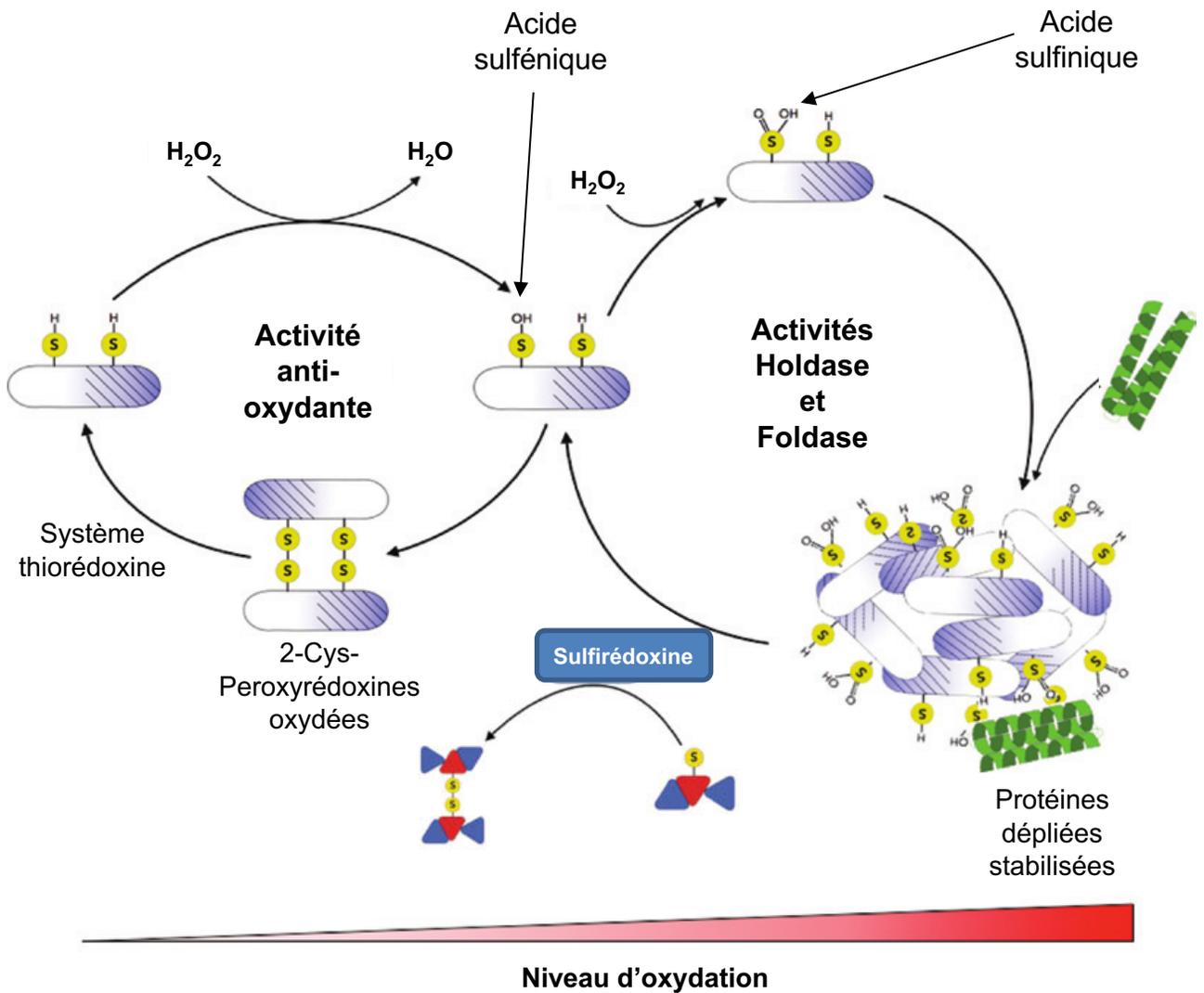


Figure 13 : Activité chaperonne parmi d'autres activités : l'exemple de la balance redox-dépendante entre les deux activités de la 2-cys-peroxyrédoxine « typique ».

Lors de conditions normales, la 2-cys-peroxyrédoxine agit comme une peroxydase en catalysant le peroxyde d'hydrogène contrôlant ainsi le niveau cellulaire de ce dernier. Ceci entraîne la sulfénylation d'une de ces cystéines puis la formation de deux ponts disulfures intercellulaires entre un homodimère. Cet homodimère va être réduit par le système thiorédoxine. Lorsque les conditions intracellulaires se dégradent par un stress oxydatif fort (pouvant être généré par un stress thermique), la cystéine sulfénylée est sulfénylée ce qui entraîne un changement de fonction vers une activité holdase. Les 2-cys-peroxyrédoxines vont former un homo-oligomère afin de protéger un substrat déplié et le stabiliser. Une fois que les conditions oxydantes se sont adoucies, l'homo-oligomère est réduit, libérant le substrat qui va être replié soit par d'autres foldases en présence d'ATP, soit par la 2-cys-peroxyrédoxine. Modifiée de Conway and Lee. 2015

son domaine C-terminal (Goemans et al., 2018). Cette modification augmente l'hydrophobicité de CnoX et permet son interaction avec des substrats non pliés. Elle protège alors les substrats d'autres chaperonnes telles que DnaK/J/GrpE de l'agrégation provoquée par l'HOCl. En plus d'empêcher l'agrégation des protéines, CnoX, qui affiche un repli de thiorédoxine et un tétratricopeptide (TPR), fournit également une protection contre l'oxydation irréversible. Elle est capable de former des complexes disulfures mélangés avec ses substrats ce qui protège leurs cystéines sensibles de la suroxydation. La famille des 2-cys-peroxyrédoxines typiques est composée d'enzymes anti-oxydantes de type peroxydase qui réduisent l'H₂O₂ chez les eucaryotes (Hall et al., 2009). Dans sa fonction de catabolisme de l'H₂O₂, la cystéine catabolique du site actif de 2-Cys Per est oxydée en acide sulfénique (-SOH) par l'H₂O₂ qui agit comme substrat (Figure 13) (Hofmann et al., 2002; Wood et al., 2003; Moon et al., 2005; Conway and Lee, 2015). La 2-Cys Per va ensuite former un dimère avec une autre 2-Cys Per par deux ponts disulfures intermoléculaires. Le système thiorédoxine va réduire le dimère et les cystéines de ces 2-Cys Per vont être à nouveau fonctionnelles sous leur forme thiolate (SH). Lorsque les niveaux intracellulaires d'H₂O₂ sont plus importants la cystéine sulfénylée va être sulfinylée (-SO₂H), ce qui va activer son activité holdase et lui permettre de former un décamère protégeant les protéines dépliées de l'agrégation (activité holdase). Lorsque les conditions deviennent moins oxydantes, les protéines dépliées vont être directement repliées par les 2-Cys Per jusqu'à un état natif (activité foldase). La réduction des cystéines sulfinylées de 2-Cys Per par la sulfirédoxine (SRX) rétablit la structure monomérique de la 2-Cys Per.

III.4 Les mécanismes de régulation des protéines chaperonnes :

Certaines protéines chaperonnes ne sont actives qu'en réponse à un stimulus. Le butanol ou les tanins (Spy), la température ambiante (sHSP) ou l'état redox de l'environnement cellulaire (2-CysPer et HSP33) semblent jouer un rôle crucial dans les affinités avec leur substrat. Certaines petites HSP telles que HSP26 et HSP16.9 sont régulées par la température. Par exemple, l'activité holdase d'HSP26 et d'HSP42 chez *Saccharomyces cerevisiae* est activée lors d'un stress thermique (Haslbeck et al., 1999, 2004). Dans les deux mutants *hsp26* et *hsp42* lors d'un stress thermique, l'agrégation des protéines augmente soulignant leur rôle dans la prévention de l'agrégation des protéines. L'état redox de la cellule peut réguler certaines protéines chaperonnes. C'est le cas de l'HSP33 qui est induite lors d'un stress thermique et protège les cellules contre le stress oxydatif. HSP33 est une chaperonne dont l'activité est régulée en fonction de l'environnement redox cellulaire. C'est une protéine conservée avec des homologues identifiés dans la majorité des procaryotes et dans quelques parasites eucaryotes unicellulaires. HSP33 est une holdase qui protège les bactéries du stress oxydatif en empêchant les

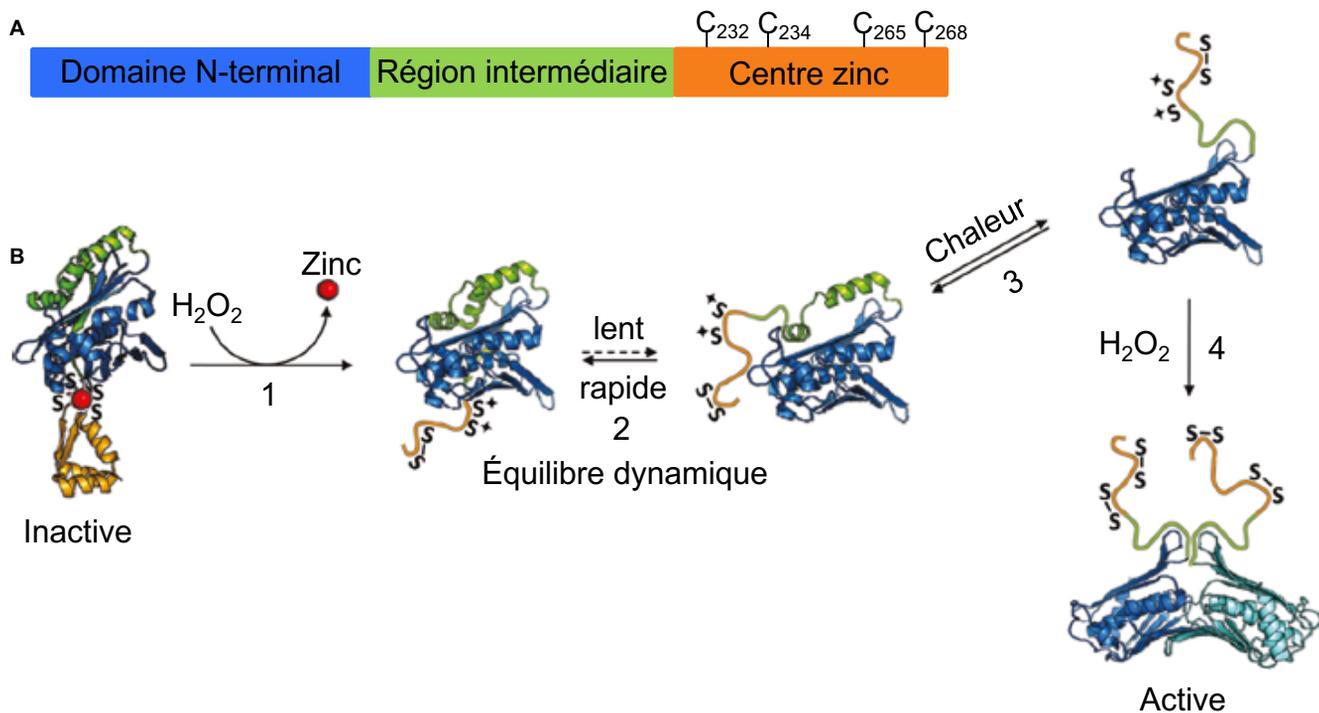


Figure 14 : Modèle de l'activation par modification redox de la protéine bactérienne HSP33.

(A) Structure de la protéine HSP33. Elle est composée de 3 domaines, un domaine N-terminal, une région intermédiaire liant ce premier domaine et le troisième domaine pouvant contenir un zinc. Le troisième domaine contient quatre cystéines qui sont importantes dans la fonction de la protéine, leur oxydation la rendant active. (B) La protéine HSP33 se trouve sous forme inactive en condition normale où elle contient un zinc en son centre zinc. Le contact avec de l'H₂O₂ ou de l'HOCl (acide hypochloreux) fait perdre le zinc et changer légèrement la conformation de HSP33 rendant les quatre cystéines de ce domaine accessibles (1). Ces molécules vont oxyder deux des quatre cystéines réduites de la protéine HSP33 et entraîner la formation d'un pont disulfure intracellulaire et à nouveau un léger changement de conformation (2). HSP33 a tendance à rapidement retourner à un état de conformation plus compacté (2 à gauche). La chaleur est alors nécessaire en complément de molécules oxydantes pour oxyder les deux autres cystéines du domaine zinc (3 et 4). HSP33 se dimérise et adopte alors une conformation active. Modifiée de Kumsta et al., 2009

protéines dépliées de s'agréger (Winter et al., 2005, 2008). Elle est finement régulée au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Elle est exprimée constitutivement en conditions normales et elle est fortement induite lors d'un stress thermique (Chuang and Blattner, 1993; Kang et al., 2007). Pour être activée, HSP33 nécessite la présence simultanée de fortes températures et d'un oxydant tel que l' H_2O_2 (Jakob et al., 1999; Graumann et al., 2001; Winter et al., 2005; Kumsta and Jakob, 2009). C'est une protéine contenant trois domaines dont un domaine pouvant porter un zinc et contenant quatre cystéines (Figure 14) (Kumsta and Jakob, 2009). Sous sa forme inactive, les quatre cystéines sont maintenues inaccessibles au centre de la protéine et lient un atome de zinc. Des molécules oxydantes telles que l' H_2O_2 vont oxyder la protéine qui va perdre le zinc et changer de conformation rendant les cystéines accessibles. Deux des quatre cystéines vont former un pont disulfure intramoléculaire. Sous cette forme la protéine n'est toujours pas active. C'est l'ajout de la chaleur en complément de l' H_2O_2 qui va permettre d'oxyder les deux autres cystéines formant un second pont disulfure intramoléculaire. La protéine se dimérise avec une seconde HSP33 devenant ainsi active pour accomplir sa fonction de holdase, protéger des protéines dépliées de l'agréation.

III.5 Etude de la thermotolérance chez les plantes :

Le stress thermique déclenche donc une réponse multidimensionnelle (HSR) chez la plante qui lui confère une tolérance à la chaleur. Après le stress, le taux d'HSF/HSP est différent du contenu d'une cellule non stressée. La quantité et la nature des HSF/HSP définissent donc l'état acclimaté. Par exemple, en plus des protéines présentes lors du stress, les HSFA3, HSFA7a et HSFA7b sont des protéines induites par HSFA2 et/ou HSFA1 après un stress thermique (Liu and Charng, 2013). Elles maintiennent (conjointement avec HSFA1 ou séparément) une HSR forte lors de stress répétés à long terme. À cet égard, HSFA2, HSFA3 et HSFA7a sont considérés comme les plus puissants activateurs de la transcription d'HSP pendant la récupération. Ils sont responsables du phénotype d'acclimatation à la chaleur (Charng et al., 2006; Nishizawa et al., 2006; Schramm et al., 2008).

Chez *Arabidopsis thaliana*, le stress thermique est étudié de différentes manières afin de comprendre les mécanismes de thermotolérance mis en place par la plante. Quatre conditions de stress thermiques ont été définies afin d'étudier l'acclimatation des plantes : un traitement long à température moyennement élevée (TMHT : thermotolérance à des températures modérément élevées), un traitement court à haute température (BT : thermotolérance basale) et deux autres avec deux traitements à haute température espacés d'un temps d'adaptation court (quelques heures) (SAT : thermotolérance acquise à court terme) ou long (quelques jours) LAT (thermotolérance acquise à long

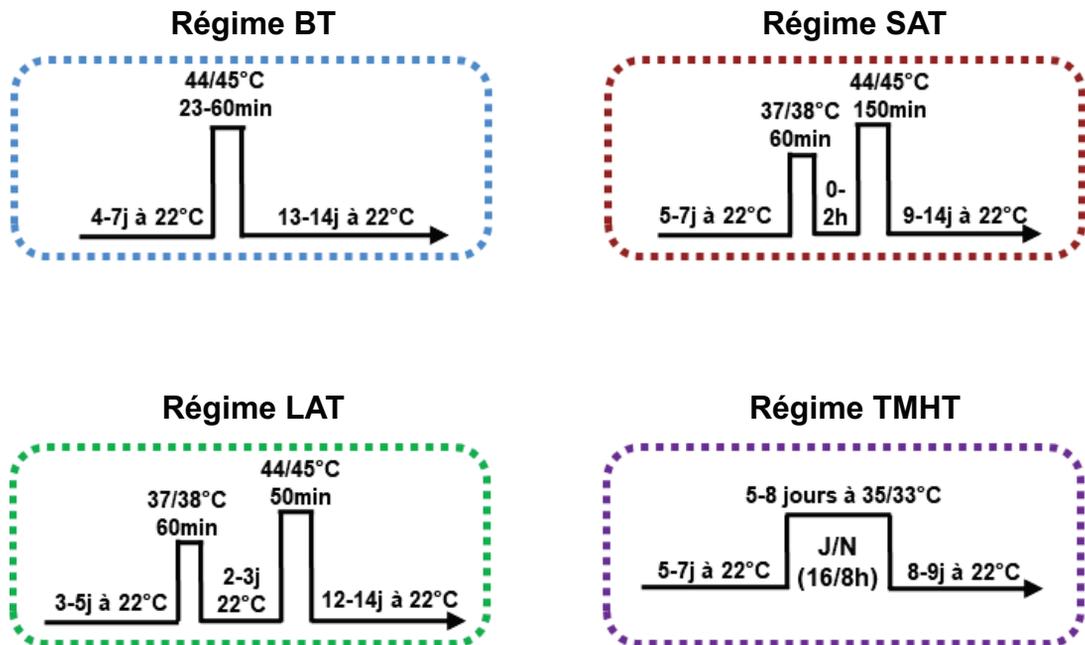


Figure 15 : Exemple de quatre régimes utilisés lors de l'étude de la thermotolérance chez *Arabidopsis thaliana*.

Il s'agit du régime **BT** (thermotolérance basale), **SAT** (thermotolérance acquise à court terme), **LAT** (thermotolérance acquise à long terme) et **TMHT** (thermotolérance à des températures modérément élevées). Régimes proposés par Yeh et al., 2012 et modifiés à partir de Liu and Charng, 2013 et de nos essais personnels.

terme) (Figure 15) (Yeh et al., 2012; Liu and Charng, 2013). La capacité des plantes à répondre et à s'acclimater à de tels traitements est testée en mesurant la survie des plantes plusieurs jours après l'application du stress (Larkindale and Vierling, 2008). Pour les régimes SAT et LAT, le premier traitement, à température généralement plus basse, sert de « priming ». Par exemple, après un priming d'1h30 à 36-38°C, les plantes sont à nouveau placées 2h à 21°C avant de subir l'application d'un nouveau traitement thermique cette fois-ci sur un temps plus long à 45°C (Mittler et al., 2012). Ce priming permet à la plante d'être préparée au stress thermique.

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence qu'il existait des mécanismes de réponses moléculaires spécifiques à chaque type de traitement. Par exemple le co-activateur MBF1c est un régulateur clé de la thermotolérance chez *Arabidopsis thaliana* (Suzuki et al., 2008). Il est requis pour la thermotolérance basale et fonctionne en amont des voies de l'acide salicylique, du tréhalose et de l'éthylène durant le stress thermique. Cependant, ce co-activateur n'est pas nécessaire lors de la thermotolérance acquise (Dafny-Yelin et al., 2008; Suzuki et al., 2008). HSP101 est, quant à elle, nécessaire dans les thermotolérances basale et acquise (Queitsch et al., 2000; Liu et al., 2011). Le mutant *hsp101* est donc utilisé comme contrôle positif du traitement thermique lors des régimes BT, SAT et LAT. Pour la TMHT, il s'agit du quadruple mutant des 4 gènes HSFA1a, b, d et e qui est très sensible aux traitements thermiques (Liu et al., 2011). Ces HSF sont également responsables de la thermotolérance basale. Des facteurs importants de la réponse au stress thermique ont été mis en évidence lors de l'application des régimes de thermotolérance. Il s'agit d'HSP70 et les petits sHSP, les ROS et les enzymes anti-oxydantes telles que l'APX1b (Mittler et al., 2012). Ces éléments sont plus exprimés lorsque la plante subit un priming (Mittler et al., 2012; Bäurle, 2016). Lorsqu'elle est conditionnée au stress thermique, *Arabidopsis thaliana* est donc capable d'acquérir des niveaux accrus de thermotolérance et des niveaux plus bas de dommages oxydatifs par rapport à une plante non-conditionnée et cette protection contre les dommages oxydatifs est liée à de plus grands taux de survie de ces plantes (Larkindale and Knight, 2002). Elle implique le calcium, l'acide abscissique, l'éthylène et l'acide salicylique. Il a également été montré que la thermotolérance peut être induite par des composés qui sont responsables de vagues oxydatives (Dat et al., 2000). La surexpression d'HSFA1a dans *Arabidopsis thaliana* a abouti à une augmentation de la thermotolérance basale. Cette thermotolérance était également associée à une augmentation de l'induction d'APX1b (Lee et al., 1995; Mittler et al., 2012). Cela suggère qu'un aspect de la thermotolérance chez *Arabidopsis thaliana* est une capacité accrue à prévenir ou réparer les dommages oxydatifs induits par la chaleur.

IV. Le contrôle du stress oxydatif :

IV.1 Par la détoxification des ROS :

IV.1.1 Les molécules anti-oxydantes :

Il a été vu précédemment qu'une production excessive de ROS conduit à endommager les protéines, les lipides et l'ADN et provoque un stress oxydatif, qui est un facteur central lors du stress thermique (Noctor et al., 2017). Afin de gérer les dommages oxydatifs, préserver l'intégrité des cellules et de l'organisme entier, des systèmes d'élimination de ces espèces réactives de l'oxygène sont donc nécessaires (Foyer and Noctor, 2005; Rouhier et al., 2008; Noctor et al., 2017). Deux molécules abondantes dans la cellule interviennent dans la détoxification des ROS, il s'agit de l'ascorbate et du glutathion. Elles peuvent également servir de source de pouvoir réducteur à de nombreuses enzymes, elles-mêmes impliquées dans la détoxification des ROS (Foyer and Noctor, 2005).

IV.1.1.1 L'ascorbate :

L'ascorbate est une molécule soluble existant principalement sous forme réduite. Très abondante dans les cellules (jusqu'à 20 et 50mM dans les chloroplastes), elle est synthétisée à partir du galactose par des enzymes cytosoliques et mitochondriales (Foyer et al., 1983; Smirnoff and Critchley, 2000). L'ascorbate détoxifie directement les ROS en réagissant avec l'anion superoxyde ou l'oxygène singulet pour former de l' H_2O_2 , du monodéhydroascorbate et du déhydroascorbate. L'étude du mutant *vtc2*, un gène codant pour une protéine impliquée dans la biosynthèse de l'ascorbate, montre que cette molécule joue un rôle important dans la protection face à une forte intensité lumineuse. En effet, ce mutant qui ne produit que 10 à 30% de l'ascorbate est très sensible à la lumière. Il présente une dérégulation dans l'expression d'enzymes impliquées dans la défense contre le stress et une quantité accrue de peroxydation lipidique (Giacomelli et al., 2006; Muller-Moule et al., 2003).

IV.1.1.2 Le glutathion :

Le glutathion est le principal thiol de faible poids moléculaire dans la plupart des cellules (de l'ordre du mM). C'est un tripeptide composé d'acide glutamique, cystéine et de glycine qui maintient le potentiel redox de la cellule en intervenant dans un certain nombre de réactions de détoxifications et d'éliminations d'espèces réactives de l'oxygène. Le glutathion est synthétisé en deux étapes dépendantes de l'ATP et par deux enzymes, la γ -glutamylcystéine synthétase (γ -ECS codée par

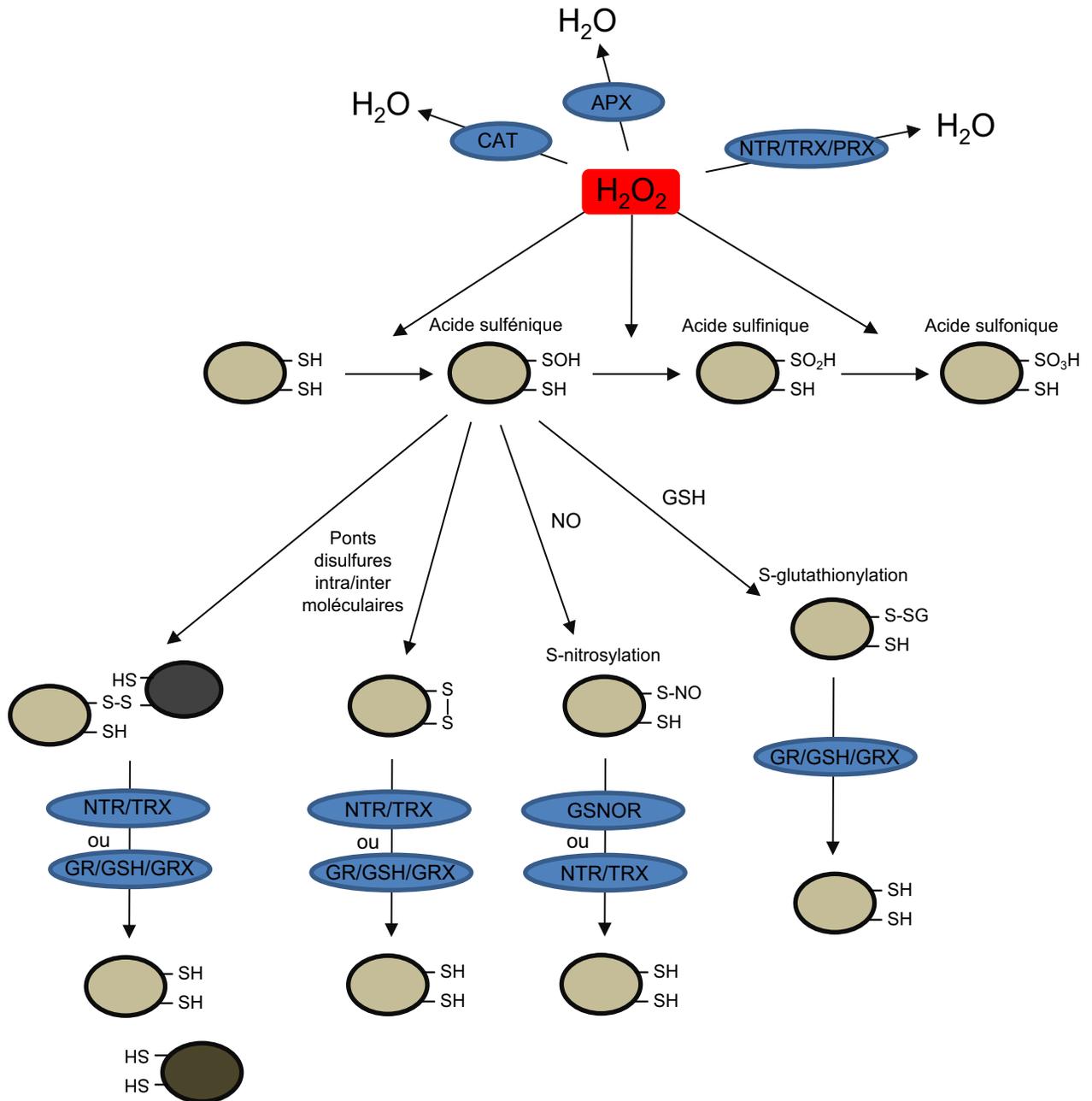


Figure 16 : Rôle de l' H_2O_2 dans l'oxydation des thiols des protéines.

L' H_2O_2 qui s'accumule dans la cellule peut être détournée par des catalases CATs, des ascorbates peroxydases APX ou bien par le système NTR/TRX/PRX. L' H_2O_2 peut oxyder les résidus de thiol dans les protéines. L'acide sulfénique réagit avec le GSH ou le NO avec les résidus thiol adjacents. Des protéines sujettes à la formation de liaisons S-glutathionylées, S-nitrosylées ou disulfures sont également représentées. Des liaisons S-glutathionylées, S-nitrosylées ou des ponts disulfures intra/intermoléculaires peuvent être réduits par les systèmes NTR/TRX, GR/GSH/GRX ou GSNOR. **NTR** : Thiorédoxine réductase NADPH-dépendante ; **TRX** : thiorédoxine ; **GR** : glutathion réductase ; **GRX** : glutarédoxine ; **PRX** : peroxyredoxine ; **GSNOR** : S-nitrosoglutathion réductase ; **GSH** : glutathion réduit ; **NO** : oxyde nitrique ; **H_2O_2** : peroxyde d'hydrogène. Modifiée de Martins et al., 2018.

GSH1) et la glutathion synthétase (GSH-S codée par *GSH2*) (Rennenberg et al., 1980; Meister, 1988; Noctor et al., 2002; Mullineaux and Rausch, 2005). La première étape de synthèse du glutathion est plastidiale, la GSH1 étant localisée dans les plastides. La seconde étape est probablement cytosolique puisque la GSH2 code deux transcrits dans les chloroplastes et le cytosol dont la forme la plus courte et la plus abondante est la GSH-2 cytosolique (Wachter et al., 2005). Le glutathion est essentiel chez les plantes puisque un mutant nul *gsh1* pour la première enzyme de la voie de synthèse du GSH est embryon-létal (Cairns et al., 2006). Le glutathion réduit (GSH) est une barrière face aux ROS. Il empêche une oxydation excessive des cellules grâce à son rôle de donneur d'électron aux enzymes du cycle glutathion-ascorbate (activités des APX), aux GRX (thiols impliqués dans la réduction des macromolécules oxydées), aux PRX et aux glutathion peroxydases (GPX). Dans ces réactions, le GSH va être oxydé en GSSG. La glutathion réductase (GR) et le NADPH vont permettre à la cellule de disposer d'un stock permanent de GSH en réduisant ce GSSG en GSH. Le glutathion peut également avoir une autre forme oxydée qui est le nitrosogluthathion (GSNO).

IV.1.2 Les enzymes anti-oxydantes :

Il existe différentes enzymes capables de détoxifier la cellule des espèces réactives de l'oxygène. Il y a par exemple, la superoxyde dismutase (SOD) qui va convertir l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 5). Les plantes contiennent plusieurs types d'enzymes capables de métaboliser les peroxydes tels que l' H_2O_2 . Il y a les catalases, les ascorbates peroxydases, divers types de peroxyrédoxines, des glutathions peroxydases et les glutathions S-transférases (GST) (Figure 16) (Asada, 1999; Wagner et al., 2002; Dietz, 2003; Iqbal et al., 2006; Mhamdi et al., 2010). Les APX et les CAT se distinguent des autres par leur haute spécificité envers l' H_2O_2 . Chez *Arabidopsis thaliana*, le mutant catalase 2 (*cat2*) montre une croissance réduite. Ce phénotype est dû à l'incapacité du mutant *cat2* à récupérer de l'excès d' H_2O_2 produit dans les peroxyosomes au cours de métabolisme photorespiratoire. Ce phénotype est sauvé sous conditions élevées en CO_2 qui inhibent le métabolisme photorespiratoire (Queval et al., 2007).

IV.2 Par les systèmes de réduction :

IV.2.1 L'oxydation des thiols :

Un thiol est le nom donné à une cystéine portant un groupe sulfhydryle (-SH). Chez les formes déprotonées, l'atome de soufre devient l'anion thiolate (S⁻), un nucléophile réactif ce qui le rend plus sensible à l'oxydation (Roos and Messens, 2011). Cet anion thiolate peut réagir avec un autre thiol et

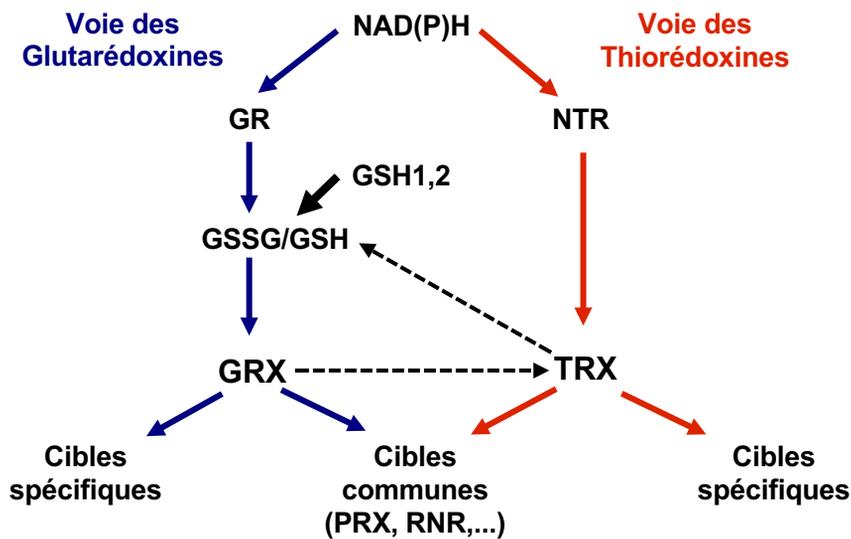


Figure 17 : La réduction des TRX et des GRX dans le cytosol.

La voie classique de réduction des TRX à droite avec NADPH/NTR/TRX et des GRX à gauche avec NADPH/GR/GSH/GRX. Ces voies sont représentées par des flèches continues tandis que les chemins alternatifs (réduction de TRX dépendant de GRX et réduction du GSSG dépendant de TRX) sont indiqués par des lignes pointillées. Les GRX et les TRX vont agir sur des cibles spécifiques ou communes comme les peroxyrédoxines (PRX) ou encore les ribonucléotides réductases (RNR). Inspirée de Meyer et al., 2012.

former une liaison covalente de type pont disulfure ou bien être en contact avec des ROS. Les ROS comme l' H_2O_2 sont capables d'oxyder le thiol d'une protéine ce qui provoque sa sulfénylation et la formation d'un acide sulfénique (-SOH) (Figure 16) (Martins et al., 2018). Dans le cas où l'oxydation perdure, cette cystéine se suroxyde en subissant deux oxydations supplémentaires : la sulfinylation (-SO₂H) et la sulfonylation (-SO₃H) qui sont des modifications irréversibles sauf dans de rares cas où l'acide sulfinique peut être réduit par les sulfirédoxines (SRX). D'autres types de modifications de thiols peuvent intervenir, tels que la sulfhydrylation, la thiosulfuration ou la sulfenylamidation. Le premier niveau d'oxydation, le sulfényl (-SOH), est responsable de la formation de ponts disulfures intra ou intermoléculaire (Figure 16) (Martins et al., 2018). Il est également responsable de la formation de S-nitrosyl (-S-NO) en présence de NO, c'est ce que l'on appelle la S-nitrosylation ou de S-glutathionyl (-S-SG) en présence de GSH qui est appelé la S-glutathionylation. Les thiorédoxines (TRX) et les glutarédoxines (GRX) sont capables de réduire ces dernières modifications des thiols.

IV.2.2 La réduction des thiols par les TRX et les GRX :

Deux familles de protéines de petite taille, nommées thiorédoxines et glutarédoxines sont présentes chez la plupart des organismes. Parfois en très grand nombre comme chez les plantes, elles sont capables de réduire différents types d'oxydation des thiols. Les TRX, qui sont des petites oxydoréductases de faible masse moléculaire (10 à 14 kDa), présentent une structure tridimensionnelle caractéristique, un noyau central composé de cinq feuillets β entourés de quatre hélices α . Elles possèdent un site actif composé de deux cystéines espacées de deux acides aminés fortement conservés (généralement WCG/PPC) et exposées de façon à favoriser l'interaction avec les substrats (Capitani et al., 2000). Les TRX ont été identifiées il y a plusieurs décennies chez *Escherichia Coli* comme des réducteurs de thiols oxydés, permettant le transfert du pouvoir rédox sur la ribonucléotide réductase (RNR), un élément essentiel à la synthèse de l'ADN (Laurent et al., 1964). Ces TRX sont dépendantes pour leur réduction de la NADPH Thiorédoxine Réductase (NTR) elle-même dépendante du NAD(P)H (Figure 17) (Colleen et al., 1964). Elles sont présentes chez la plupart des organismes en particulier chez les bactéries et les eucaryotes (Meyer et al., 2009). Les GRX sont des petites oxydoréductases (10 à 14kDa) présentes chez la plupart des organismes (Meyer et al., 2009). Elles sont capables de réduire l'oxydation de thiols *via* leur site actif composé de quatre acides aminés contenant au moins une cystéine en première position. Cette réaction est dépendante du glutathion réduit (GSH) qui va réduire les GRX oxydées (Figure 17). Ce système est également composé de la glutathion réductase (GR) et de NADPH qui vont permettre au glutathion oxydé (GSSG) d'être réduit afin d'être réutilisé (Meyer et al., 2009).

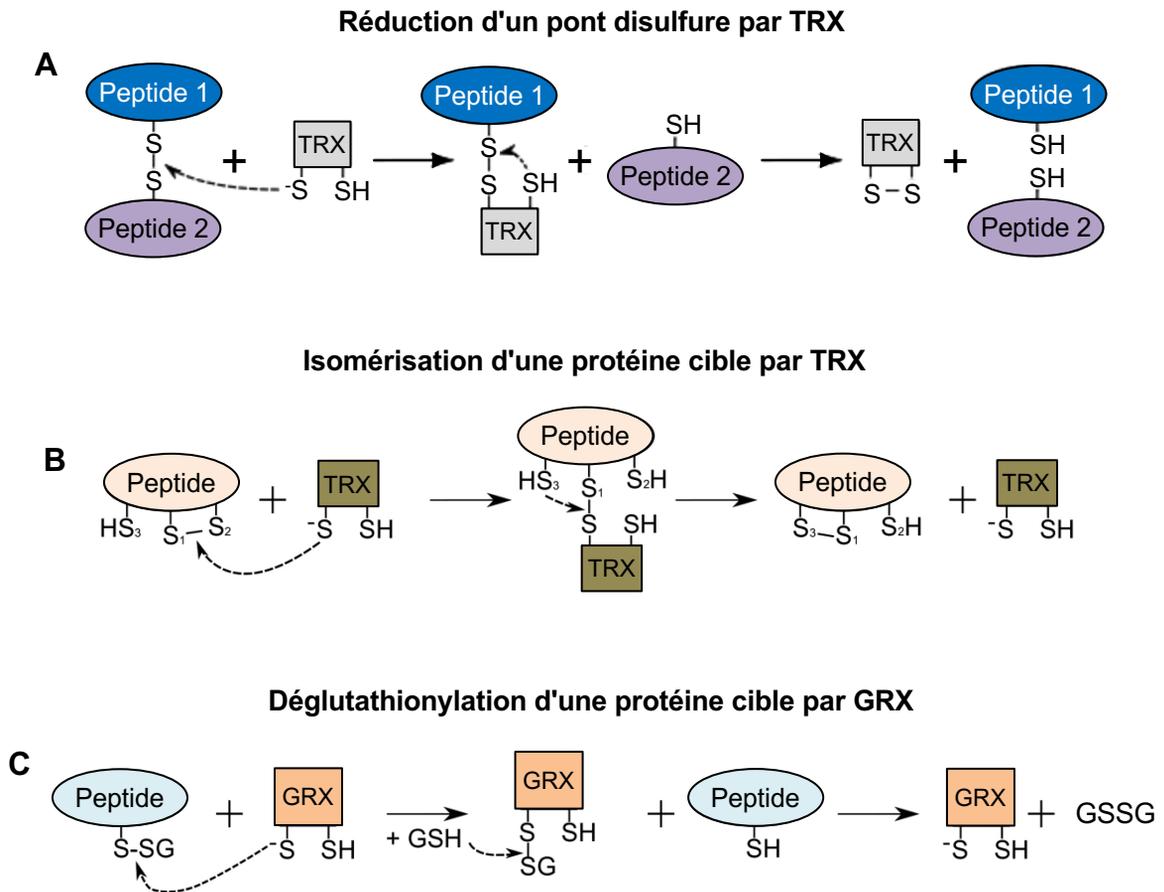


Figure 18 : Mécanismes de réduction des TRX et GRX.

(A) Réduction par TRX d'un pont disulfure intermoléculaire formé entre les cystéines de deux protéines. Les deux cystéines catalytiques de TRX sont nécessaires pour compléter la réaction. La cystéine catalytique déprotonée (S^-) agit comme un nucléophile et attaque le pont disulfure. Un pont disulfure mixte est formé entre la cystéine catalytique de la rédoxine et la cystéine du peptide cible. Ce pont disulfure est ensuite attaqué par la cystéine (SH) de la rédoxine. Elle forme alors un pont disulfure avec le thiol catalytique. Le peptide cible ainsi réduit est libéré. (B) Isomérisation d'une protéine cible par TRX. Seule la cystéine catalytique est nécessaire. L'isomérisation peut être réalisée par une TRX mono ou dicystéinique, ainsi que par les protéines disulfures isomérases (PDI). Comme pour les réactions précédentes, la cystéine catalytique attaque le pont disulfure (S_1-S_2) et forme un disulfure mixte. Le troisième thiol du peptide (HS_3) va réduire le disulfure mixte, en libérant la TRX et en formant un disulfure avec S_1 . (C) Déglutathionylation d'une protéine cible par GRX. Ici, seuls la cystéine catalytique et le GSH sont nécessaires. La déglutathionylation est généralement considérée comme effectuée par une GRX mono ou dicystéinique. Le thiol catalytique de GRX attaque le disulfure du peptide glutathionylé, libère le peptide réduit et devient glutathionylé. Une autre molécule de GSH réduit le thiol glutathionylé de GRX. Modifiée de Meyer et al., 2012.

IV.2.2.1 La réduction et l'isomérisation des ponts disulfures :

La présence ou l'absence des ponts disulfures peut activer/désactiver certaines enzymes. C'est par exemple le cas des enzymes participant au métabolisme carboné chez les plantes telles que la RuBisCO, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la phosphoribulose kinase (PRK), la malate déshydrogénase dépendante du NADP (MDH) et la fructose-1,6-biphosphatase (FBPase) (Schürmann and Buchanan, 2008). Ces ponts peuvent aussi participer au cycle catalytique d'enzymes pour le transfert d'électrons comme les peroxyrédoxines (PRX) ou les ribonucléotides réductases (RNR) (Avval and Holmgren, 2009; Thelander and Reichard, 1979).

Les ponts disulfures peuvent être réduits par les TRX et certaines GRX de type dithiol (contenant deux cystéines dans leur site actif à l'inverse des monothiols qui n'en possèdent qu'une), dans ce dernier cas, le mécanisme fait intervenir la déglutathionylation (Figures 16 et 18) (Meyer et al., 2012). Le processus de réduction est nommé mécanisme dithiol et va démarrer avec la première cystéine du site actif en N-terminal, la cystéine catalytique, qui va réduire le thiol de la cible, la libérant (Figure 18A) (Brandes et al., 1993). La rédoxine va ainsi former un pont disulfure avec la cible (complexe intermédiaire) avant de la réduire avec la seconde cystéine du site actif afin de récupérer la totalité du pont disulfure libérant le second peptide. La rédoxine oxydée va être réduite par son système de réduction pour être à nouveau active. Une protéine peut posséder un pont disulfure mal placé entre deux cystéines ce qui lui donne un mauvais repliement. Ce pont disulfure peut être isomérisé c'est-à-dire être placé sur une autre cystéine libre afin de permettre un meilleur repliement (Figure 18B) (Meyer et al., 2012). La TRX va cibler le pont disulfure intramoléculaire mal placé avec sa cystéine réduite afin de former un pont disulfure extramoléculaire avec sa cible. Le pont disulfure va ainsi être remplacé sur une autre cystéine pour garantir un meilleur repliement. Certaines TRX et GRX, notamment chez les plantes, codent des monothiols (CXXS) qui sont capables d'isomériser des protéines cibles mais incapables de réduire le pont disulfure formé entre deux cystéines (Serrato et al., 2008).

Les protéines disulfures isomérases (PDI) sont également capables d'isomériser ces ponts disulfures (Freedman et al., 1994; Wilkinson and Gilbert, 2004). Par exemple, les PDI réalisent le déplacement de ponts disulfures dans le réticulum endoplasmique (RE) qui est un compartiment cellulaire oxydant. Elles ont une structure proche des TRX et sont présentes chez la plupart des eucaryotes (Edman et al., 1985; Houston et al., 2005). Ce sont des chaperonnes moléculaires importantes dans de nombreuses fonctions telles que le repliement des protéines ou l'isomérisation des ponts disulfures (Freedman et al., 1994; Wilkinson and Gilbert, 2004).

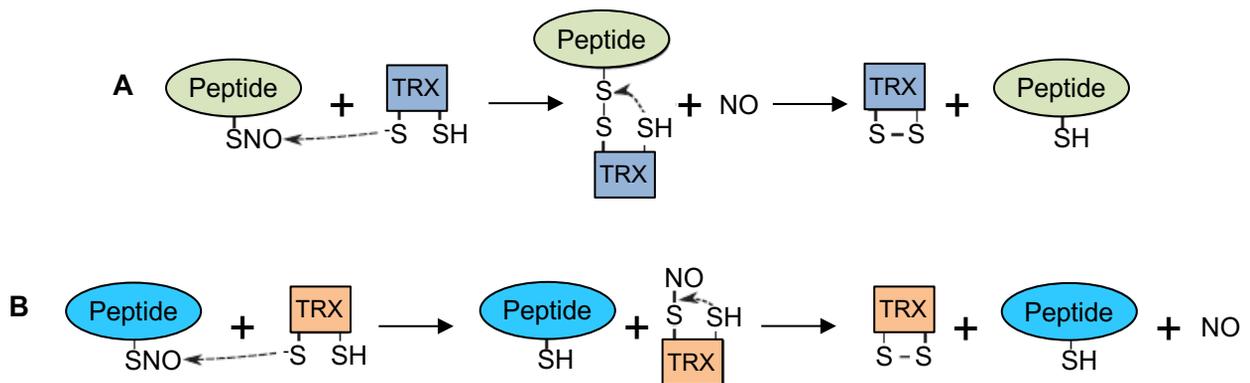


Figure 19 : Dénitrosylation de la protéine cible nitrosylée par TRX.

Deux mécanismes de réduction alternatifs du S-nitrosothiol (SNO) ont été proposés. Les cystéines S- et SH de TRX sont nécessaires pour compléter les réactions. Dans la littérature, la dénitrosylation est considérée comme effectuée par les TRX mais les GRX peuvent probablement agir de manière similaire. **(A)** La première étape est l'attaque du SNO par la cystéine catalytique, libérant de l'oxyde nitrique (NO) et formant un intermédiaire disulfure mixte qui est réduit par la seconde cystéine de TRX. **(B)** Dans la réaction alternative, la première étape est la même, mais le NO est transféré au thiol catalytique et le peptide réduit est libéré. Le SNO lié est alors réduit par la seconde cystéine, libérant le NO. Modifiée de Meyer et al., 2012.

IV.2.2.2 La déglutathionylation :

Les cystéines peuvent être glutathionylées (-SSG) de manière spontanée par différents mécanismes mais généralement ceci est renforcé par la production de ROS (Figure 16) (Michelet et al., 2006; Rouhier et al., 2008; Zaffagnini et al., 2012b; Martins et al., 2018). Il y a quelques évidences que des GRX, comme le GSH, peuvent glutathionyler (Meyer et al., 2012). La déglutathionylation se fait par les rédoxines dans tous les organismes (Figure 18C) (Meyer et al., 2012). Les TRX de *Saccharomyces cerevisiae* jouent un rôle majeur dans ce processus (Greetham et al., 2010). Chez tous les autres organismes, ce sont les GRX notamment les GRX de type monothiol (CXXS) qui réduisent cet état. Le thiol catalytique de GRX va attaquer la cible glutathionylée avec l'aide du GSH (Figure 18C). La cible est alors réduite et la GRX devient glutathionylée. Une autre molécule de GSH va réduire la GRX glutathionylée, ce qui relâche du GSSG.

IV.2.2.3 La dénitrosylation :

L'oxyde nitrique (NO) peut s'attacher de manière covalente à un thiol ce qui forme un S-nitrosothiol (-SNO) (Figure 16) (Martins et al., 2018). La S-nitrosylation permet à de nombreuses protéines d'acquérir différentes fonctions leur conférant la capacité à réguler positivement ou négativement divers processus cellulaires, y compris les voies de signalisation et les voies métaboliques (Sengupta and Holmgren, 2012). Par exemple, certains facteurs nucléaires tels que AtMYB30, sont modifiés par S-nitrosylation chez la plante (Tavares et al., 2014; Martins et al., 2018). Le glutathion réduit (GSH) et le système TRX jouent un rôle majeur dans la dénitrosylation des protéines S-nitrosylées. Dans certaines conditions, la forme oxydée des TRX de mammifère peut-être S-nitrosylée ce qui peut trans-S-nitrosyler des protéines cibles telles que la Caspase 3 (Rîssig et al., 1999). Récemment chez les plantes, l'oxydoréductase TRXh5 annule les modifications du SNO en agissant en tant que réductase de protéines S-nitrosylées spécifiquement lors de la réponse immunitaire (Kneeshaw et al., 2014). Deux mécanismes ont été proposés pour la dénitrosylation par les TRX (Figure 19) (Benhar et al., 2009; Meyer et al., 2012). La réduction se ferait dans les deux cas par des TRX où deux intermédiaires différents seraient générés, un où TRX serait liée avec la protéine cible *via* un pont disulfure et un autre où TRX serait nitrosylée. Plus précisément, le premier mécanisme serait la libération du NO par la réduction de TRX et la formation d'un pont disulfure extramoléculaire entre la cible et la TRX (Figure 19A). La seconde cystéine réduirait ce pont ce qui provoquerait la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Le second mécanisme proposé serait la réduction de la cystéine nitrosylée ce qui nitrosylerait la cystéine de la TRX (Figure 19B). La seconde cystéine réduirait la première ce qui provoquerait la formation d'un pont disulfure intramoléculaire.

V. Les TRX et GRX chez les plantes :

V.1 Signalisation redox à base de thiol dans le noyau végétal (Revue) :

Cette revue a pour but d'examiner les progrès récents dans le domaine de l'oxydoréduction des thiols chez les plantes en prenant comme exemple les protéines nucléaires régulées par le redox et en se concentrant sur les systèmes de réduction nucléaires.



Thiol Based Redox Signaling in Plant Nucleus

Laura Martins^{1,2†}, José Abraham Trujillo-Hernandez^{1,2†} and Jean-Philippe Reichheld^{1,2*}

¹ Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Université Perpignan Via Domitia, Perpignan, France, ² Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, Perpignan, France

Reactive oxygen species (ROS) are well-described by-products of cellular metabolic activities, acting as signaling molecules and regulating the redox state of proteins. Solvent exposed thiol residues like cysteines are particularly sensitive to oxidation and their redox state affects structural and biochemical capacities of many proteins. While thiol redox regulation has been largely studied in several cell compartments like in the plant chloroplast, little is known about redox sensitive proteins in the nucleus. Recent works have revealed that proteins with oxidizable thiols are important for the regulation of many nuclear functions, including gene expression, transcription, epigenetics, and chromatin remodeling. Moreover, thiol reducing molecules like glutathione and specific isoforms of thiols reductases, thioredoxins and glutaredoxins were found in different nuclear subcompartments, further supporting that thiol-dependent systems are active in the nucleus. This mini-review aims to discuss recent progress in plant thiol redox field, taking examples of redox regulated nuclear proteins and focusing on major thiol redox systems acting in the nucleus.

Keywords: nucleus, thiol, glutathione, thioredoxin, glutaredoxin, ROS

INTRODUCTION

Oxygen is one of the most important molecules for aerobic organisms. It is necessary for cell metabolism, but it also generates reactive oxygen species (ROS) as by-products of oxidation-reduction pathways. ROS include free radical species like superoxides ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radicals (OH^{\bullet}), or nitric oxide (NO^{\bullet}), and non-radical species like hydrogen peroxide (H_2O_2) and peroxynitrite ($ONOO^-$) (Sies et al., 2017). In plants, major sources of ROS are photosynthetic and respiratory chains in chloroplasts and mitochondria. ROS are also generated by plasma membrane NADPH oxidases and peroxisomal xanthine oxidases. Oxidative eustress is playing important signaling functions by inducing post-translational modifications (PTM) and by regulating protein redox state. ROS can also trigger oxidative distress which can damage the cell (Foyer and Noctor, 2016; Choudhury et al., 2017). Plant cells display a large panel of ROS scavenging enzymes like catalases, peroxidases, and superoxide dismutases. They also generate compounds that reverse ROS-induced oxidations. Among these compounds are antioxidant molecules like glutathione and ascorbate, which both play important roles as cofactors for thiol reduction enzymes like peroxidases and reductases (Noctor, 2017; Rahantaniaina et al., 2017). Glutathione and ascorbate are themselves reduced by glutathione reductases (GRs) and dehydroascorbate reductases (DHARs). Thioredoxins (TRXs) and glutaredoxins (GRXs) are key thiol reduction enzymes. They act as reducing power of metabolic enzymes and ROS scavenging systems but they also regulate thiol-based post-transcriptional redox modifications in proteins (Meyer et al., 2012). Oxidized TRXs are generally

OPEN ACCESS

Edited by:

Christian Lindermayr,
Helmholtz Zentrum München –
Deutsches Forschungszentrum für
Gesundheit und Umwelt, Germany

Reviewed by:

Renu Deswal,
University of Delhi, India
Sixue Chen,
University of Florida, United States

*Correspondence:

Jean-Philippe Reichheld
jpr@univ-perp.fr

[†] These authors should be considered
as co-first authors.

Specialty section:

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

Received: 09 February 2018

Accepted: 09 May 2018

Published: 28 May 2018

Citation:

Martins L, Trujillo-Hernandez JA and
Reichheld J-P (2018) Thiol Based
Redox Signaling in Plant Nucleus.
Front. Plant Sci. 9:705.
doi: 10.3389/fpls.2018.00705

reduced by NADPH-dependent thioredoxin reductases (NTRs), whereas the reduction of GRXs is dependent on glutathione. Due to their multifunctional thiol reduction capacities, TRXs and GRXs have been involved in many metabolic functions, controlling plant developmental programs and acting as key signaling molecules in response to abiotic and biotic stresses (Meyer et al., 2009; Rouhier et al., 2015). In this mini-review, we aim to give an updated overview of nuclear thiol-based ROS signaling in plants.

ROS AND Cys Ox-PTMs IN THE NUCLEUS

Some data suggest that ROS are actively generated in the nucleus (Ashtamker et al., 2007), but they principally accumulate in the nucleus through transfer from other cell compartments. Genetically encoded fluorescent H₂O₂ sensors (e.g., HyPer) have consistently shown that cytosolic H₂O₂ freely diffuses in the nucleus through nuclear pores (Møller et al., 2007; Rodrigues et al., 2017). It is also transferred from the chloroplasts to the nucleus under pathogen and high light (HL) conditions (Caplan et al., 2015; Exposito-Rodriguez et al., 2017).

The chemical characteristics of the sulfur atom make Cys and Met residues major sites of oxidation within proteins (Davies, 2005). Depending on their pK_a and on the pH of the medium, thiol residues are deprotonated into a thiolate residue (R-S⁻) which is prone to oxidation. This is leading to successive oxidations to sulfenic (R-SOH), sulfinic (R-SO₂H), and sulfonic (R-SO₃H) acids (Davies, 2005). Thiol groups can also form a disulfide bridge (S-S) or react with reactive nitrogen species (RNS) or oxidized glutathione (GSSG) resulting in S-nitrosylation (R-SNO) or S-glutathionylation (R-S-SG). Depending on their nature, most of these thiol modifications can be reversed by dedicated thiol reduction systems (TRX, GRX, and GSNO Reductase) which exhibit disulfide bond, deglutathionylation or denitrosylation activities (Figure 1). Thiol modifications can alter the structure and/or the activity of many proteins like transcription factors, MAP kinases, and chromatin modification proteins (see below). Proteomic approaches aiming to identify oxidized thiol targets have been developed in plants. Hundreds of nuclear candidate proteins were found sulfenylated, nitrosylated, or glutathionylated (Supplementary Table 1; Zaffagnini et al., 2012, 2016; Morisse et al., 2014; Waszczak et al., 2014; Chaki et al., 2015; Pérez-Pérez et al., 2017). These approaches also revealed the complexity of the thiol redox modification networks in plants (Pérez-Pérez et al., 2017). However, among all these candidates, redox regulation has been validated only in a few cases (see below).

THIOL REDOX SYSTEMS IN THE NUCLEUS

Glutathione

Plants exhibit a large panel of thiol reduction systems (Meyer et al., 2012). Among them is glutathione, a low molecular weight

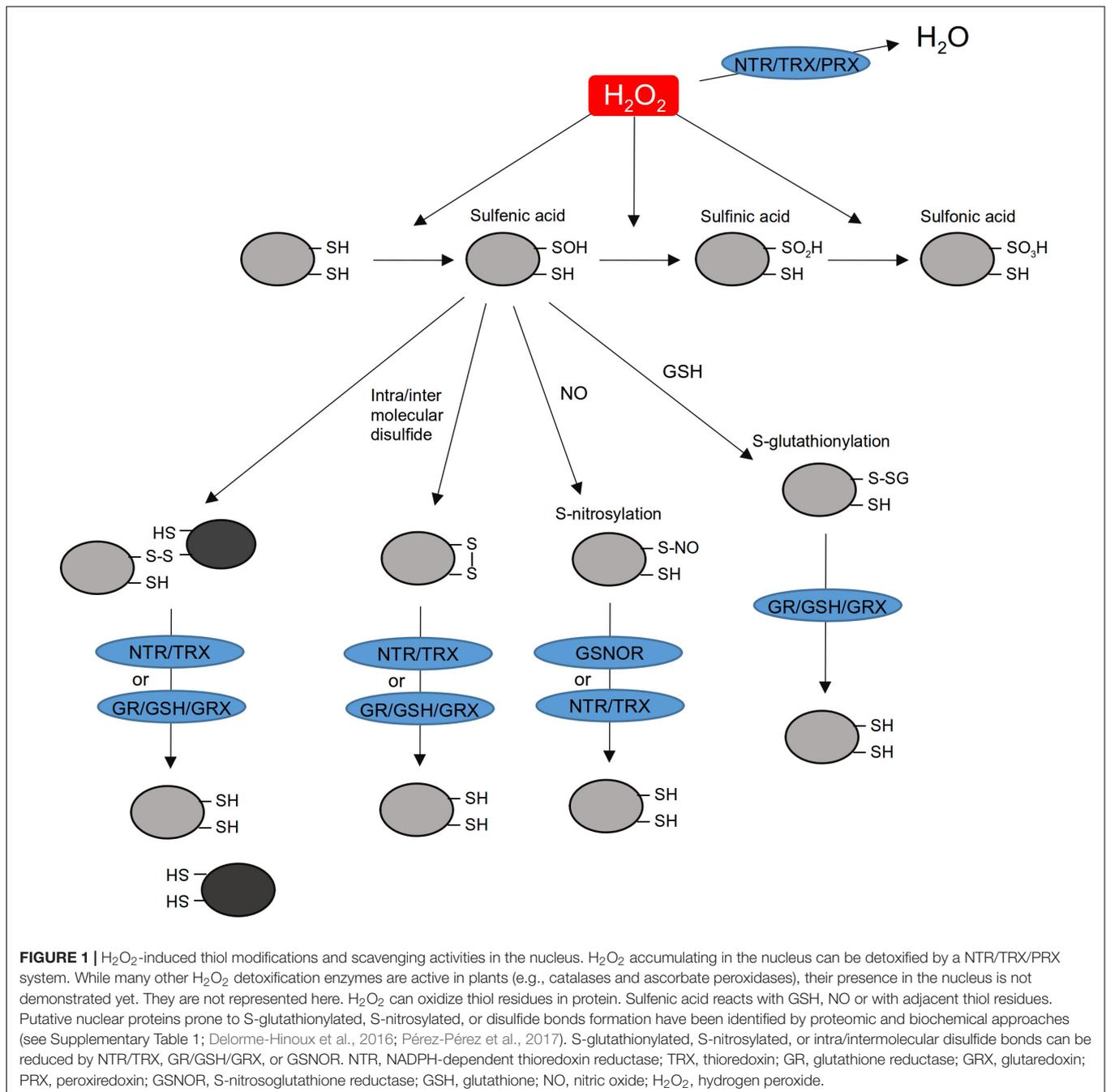
thiol-containing tripeptide (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine). Glutathione biosynthesis is performed in chloroplasts and in the cytosol but is found in almost all cell compartments, including the nucleus. Nuclear pores are generally assumed to allow unrestricted bidirectional diffusion of glutathione across the nuclear envelope. Therefore, nuclear glutathione translocation to the nucleus can be passive. Glutathione quantification at the subcellular level is technically challenging due to its highly dynamic compartmentation (Delorme-Hinoux et al., 2016). Thiol-specific dyes and genetically encoded probes such as reduction-oxidation-sensitive green fluorescent proteins (roGFPs) have consistently detected glutathione in the nucleus. Immunocytochemistry (ICC) coupled to electronic microscopy were also used to address its location at a subcompartment level (Zechmann et al., 2008; Zechmann and Müller, 2010). This study found glutathione uniformly spread in the nucleoplasm, without distinction between euchromatin and heterochromatin. In *Arabidopsis thaliana*, a glutathione reductase (GR1) is found in the nucleus, suggesting that oxidized glutathione (GSSG) is actively reduced in the nucleus (Delorme-Hinoux et al., 2016).

The functions of glutathione in the nucleus are still poorly understood. Thiol-labeling experiments using the 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) dye and glutathione redox state measured by roGFP, suggest that a redox cycle is occurring during the cell cycle progression and is critical for cell cycle progression (Diaz Vivancos et al., 2010; Vivancos et al., 2010; de Simone et al., 2017). Consistently, sustained mild oxidation observed in ascorbate mutants also restricts nuclear functions and impairs progression through the cell cycle (de Simone et al., 2017). More than acting as a general redox buffer, glutathione could also provide reducing moiety for anti-oxidant enzymes like GRXs (i.e., GRXC1, GRXC2, GRXS17, GRXS13, and ROXY1/2/4) and Glutathione S-Transferases (i.e., GSTF5-10, GSTU19/20, and GSTT19/20), several of them having been identified in the nucleus (Rouhier et al., 2015; Palm et al., 2016).

Consistent levels of ascorbate have also been found in the nucleus but little evidence for its nuclear functions has been described (Zechmann et al., 2011; Considine and Foyer, 2014; de Simone et al., 2017; Zechmann, 2017).

Thiols Reductases in the Nucleus

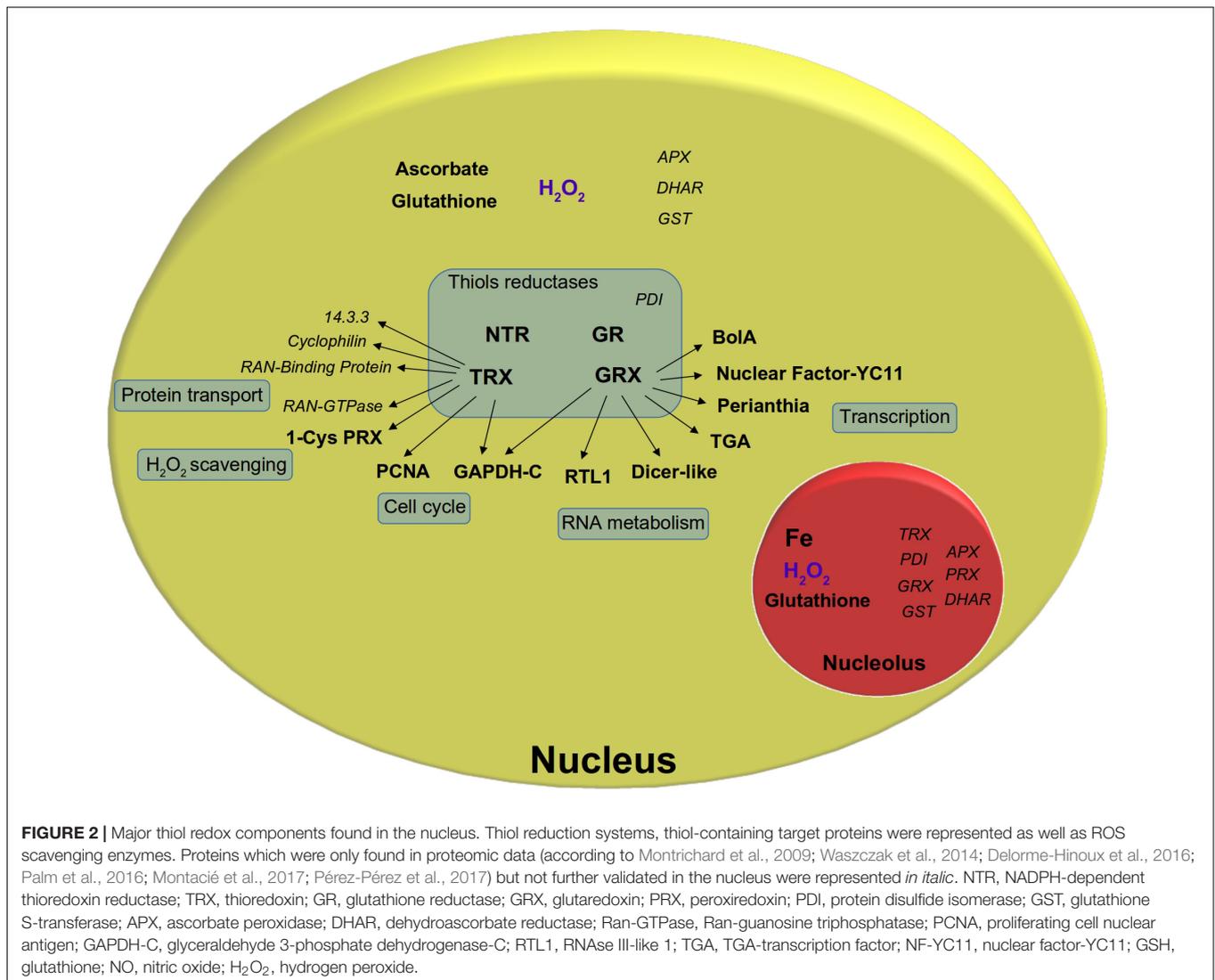
Thioredoxins (TRXs) and Glutaredoxins (GRXs) are major classes of thiols reductases. Plants harbor a complex TRX and GRX network (Meyer et al., 2012). Among the 40 TRXs and 50 GRXs isoforms were found in *Arabidopsis*, at least 4–8 of them have been assigned to the nucleus, although often in association with a cytosolic localization (Delorme-Hinoux et al., 2016). Moreover, NTR isoforms were also found in the nucleus, where they reduce TRXh, TRXo1, and Nucleoredoxin 1 (NRX1) (Serrato et al., 2001; Serrato and Cejudo, 2003; Marty et al., 2009; Marchal et al., 2014). Some thiol reductases are constitutively located in the nucleus, but others were found to shuttle between the cytosol and nucleus. In tomato subjected to heat stress, the predominant cytosolic GRXS17 was found to relocate in the nucleus (Wu et al., 2012). In wheat and *Chlamydomonas*, TRXh isoforms accumulate in the nucleus upon oxidative or genotoxic stress (Serrato and Cejudo, 2003;



Sarkar et al., 2005). Little is known about the subnuclear localization of these respective proteins. This is due to the low resolution of localization techniques like ICC and GFP-fusion coupled with confocal microscopy analyses. In most cases, these proteins are detected in the nucleoplasm, without distinction between heterochromatin and euchromatin, and are apparently excluded from the nucleolus. Recently, ICC analyses have detected NRX1 and NTRA in the nucleolar cavity, but the functional significance of this localization is still unknown (Marchal et al., 2014). Major thiol redox components found in the nucleus are presented in **Figure 2**. ROS scavenging enzymes and

thiol-containing target proteins are shown as well. Most of these components have been recently reviewed by Delorme-Hinoux et al. (2016) and will not be further discussed here.

The nucleolus, a nuclear subcompartment responsible for rRNA biosynthesis, might also be subjected to redox regulation (Saez-Vasquez and Medina, 2009). Significant accumulation of H₂O₂ has been detected in the nucleolus in tobacco cell suspension subjected to elicitor treatments (Ashtamker et al., 2007). Intriguingly, the nucleolus also accumulates high amounts of iron, which might provide substrates for ROS generation by Fenton reactions (Roschztardt et al., 2011). In addition,



glutathione and several isoforms of PRXs, DHARs, APXs, TRXs, and GRX-like proteins were enriched in this compartment (Zechmann et al., 2008; Zechmann and Müller, 2010; Palm et al., 2016; Montacié et al., 2017). Whether redox activities are occurring in the nucleolus will need further investigations.

REDOX-REGULATED NUCLEAR FUNCTIONS

Transcriptomic Control by ROS

Reactive oxygen species causes drastic changes in nuclear gene expression (Gadjev et al., 2006; Willems et al., 2016; Shaikhali and Wingsle, 2017). Oxidative stress affects many pathways involved in RNA processing, including splicing, polyadenylation, exporting, and editing. It is also involved in RNA degradation and protein translation (Van Ruyskensvelde et al., 2018). Under High-light (HL) conditions, ROS originated in chloroplasts are associated with chloroplast-to-nucleus (retrograde) signaling.

Among the molecules involved in the retrograde signaling (Suzuki et al., 2012; Vogel et al., 2014; Dietz et al., 2016), singlet oxygen (¹O₂) induces expression of subsets of ¹O₂-responsive genes and enhances tolerance to HL and to other abiotic and biotic stress (Wagner et al., 2004; Carmody et al., 2016). H₂O₂ originating by dismutation of superoxide in the chloroplast has also been recently shown to be involved in retrograde signaling upon HL exposure (Exposito-Rodríguez et al., 2017). Another retrograde signaling was suggested to involve a redox regulation of the chloroplastic cyclophilin Cyp20.3, leading to stimulation of Cys synthesis, accumulation of non-protein thiols and activation of defense gene expression (Dominguez-Solis et al., 2008; Park et al., 2013). Presumably, ROS generated in other cell compartments (mitochondria, peroxisomes, and apoplast) can also exert similar retrograde signaling (Noctor and Foyer, 2016; Rodríguez-Serrano et al., 2016).

Photorespiration produces H₂O₂ in peroxisomes. In this compartment, catalases play an important role in removing H₂O₂. The *cat2* mutant inactivated in the major peroxisomal

catalase accumulates a high level of peroxisomal H₂O₂ and impacts nuclear gene expression extensively, rapidly inducing subsets of stress and hormonal response genes (Queval et al., 2007). In this case, regulation of gene expression involves glutathione signaling also, as the transcriptomic response is partly abolished in a glutathione-defective (*cad2 cat2 cad2* double mutant (Han et al., 2013a,b). A signaling role of glutathione on nuclear gene expression was also suggested by transcriptomic data in genetically or pharmacologically manipulated glutathione backgrounds (Xiang and Oliver, 1998; Ball et al., 2004; Schnaubelt et al., 2015). Other transcriptomic analyses also showed involvement of thiol reduction systems in modulating nuclear gene expression (Bashandy et al., 2009; Martins et al., unpublished data). Whether these actors are directly involved in gene expression needs further investigations.

Redox Regulation of Transcription Factors

A likely impact of ROS on nuclear gene expression relies on the regulation of redox-sensitive transcription factors (Considine and Foyer, 2014; Dietz, 2014; Rouhier et al., 2015; Waszczak et al., 2015). In most cases, redox regulation induces conformation changes in transcription factors or associated proteins. Such modifications can occur in the cytosol and trigger nuclear translocation, e.g., by uncovering of a nuclear localization sequence (NLS). A well-documented example is the thiol redox-dependent nuclear translocation of the glycolytic enzyme Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase C (GAPDH-C) which impacts both its metabolic activity and its moonlighting function as a transcriptional activator of glycolytic genes (Holtgreffe et al., 2008; Vescovi et al., 2013; Zaffagnini et al., 2013; Testard et al., 2016; Zhang et al., 2017). The HL- and H₂O₂-dependent nuclear translocation of Heat-Shock Factors (HSFA1D and HSFA8) is also dependent on specific Cys residues (Miller and Mittler, 2006; Jung et al., 2013; Giesguth et al., 2015; Dickinson et al., 2018). The pathogen-induced Salicylic Acid (SA)-dependent transcriptional response is mediated by redox-dependent nuclear translocation of NON-EXPRESSOR OF PR GENES1 (NPR1). In this particular case, NPR1 is kept in the cytosol in a disulfide-bound oligomeric homocomplex. Upon pathogen attack, SA induces TRXh5 expression which counteracts NPR1 oligomer formation by reducing NPR1 disulfides. Moreover, through its denitrosylase activity, TRXh5 also suppresses the stimulatory effect of Cys156 S-nitrosylation on formation of disulfide-linked NPR1 oligomer (Tada et al., 2008; Kneeshaw et al., 2014). NPR1 is translocated in the nucleus where it promotes PR gene expression through interaction with TGA transcription factors such as TGA1 (Després et al., 2003; Mou et al., 2003; Tada et al., 2008; Kneeshaw et al., 2014).

Indeed, other members of the TGA transcription factors are likely redox regulated in the nucleus. Among the 10 TGA factors found in *Arabidopsis*, several of them (i.e., TGA1, TGA2, TGA3, TGA7, and Perianthia) interact with type III GRXs (ROXY1 and 2) and are involved in the development of petals, anthers and microspores. Although the redox dependent control of these TGA is not fully established, ROXY/TGA interactions

are occurring in the nucleus and affect TGA-regulated gene expression (Xing et al., 2005; Xing and Zachgo, 2008; Li et al., 2009, 2011; Murmu et al., 2010; reviewed by Dietz, 2014 and Delorme-Hinoux et al., 2016).

R2R3-type MYB transcription factors from maize require reducing conditions for DNA binding. Under non-reducing conditions, Cys49 and Cys53 form a disulfide bond that prevents the R2R3 MYB domain from binding DNA (Williams and Grotewold, 1997; Heine et al., 2004). More recently, the structure and the DNA binding activity of a AtMYB30 transcription factor were shown to be influenced by S-nitrosylation (Tavares et al., 2014).

AP2/ethylene response factor (ERF) is another class of transcription factors which undergoes redox regulation (Welsch et al., 2007; Shaikhali et al., 2008; Vogel et al., 2014). One of the most striking examples was described for the Rap2.12-dependent regulation of hypoxia response genes. Under aerobic conditions, Rap2.12 is bound to the plasma membrane within an acyl-CoA binding protein 1 or 2 (ACBP1/2) complex. In low oxygen, Rap2.12 is released from the plasma membrane by a mechanism involving a N-terminal Cys2 residue, and is translocated to the nucleus where it activates hypoxia response genes (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011; Licausi, 2013).

Comelli and Gonzalez (2007) also reported a redox regulation of conserved Cys in the homeodomain (HD) DNA of plant class III HD-Zip proteins. Here, DNA binding capacities are only maintained when an intramolecular disulfide bond is reduced by a thioredoxin (Comelli and Gonzalez, 2007). A Cys-dependent redox regulation of the DNA binding activity of basic region leucine zipper (bZIP) transcription factors has also been reported (Shaikhali et al., 2012).

Finally, a subunit of the Nuclear Factor-Y (NF-Y) transcription factor complex (NY-YC11) physically interacts with the iron-sulfur cluster glutaredoxin GRXS17 in the nucleus. It is not known yet if this interaction is redox-dependent (Knuesting et al., 2015). In the cytosol and the nucleus, GRXS17 also interacts with and reduces BOLA2, a factor involved in iron metabolism (Couturier et al., 2014; Qin et al., 2015).

Epigenetic Regulation

Redox regulation of epigenetic processes has mostly been addressed in mammals (García-Giménez et al., 2017), but this field is poorly explored in plants (Delorme-Hinoux et al., 2016; Shen et al., 2016). Nevertheless, due to the ubiquity of these basic mechanisms in living organisms, it is likely that such regulation occurs in plants as well. Different enzymes involved in histone methylation are prone to redox regulation, affecting both positive and negative histone marks (e.g., H3K4me2, H3K4me3, H3K79me3, H3K27me2, and H3K9me2) (Chen et al., 2006; Zhou et al., 2008, 2010; Niu et al., 2015). In mammals, nuclear histone acetylation activities are redox sensitive, affecting chromatin conformation and transcription (Ito et al., 2004; Ago et al., 2008; Nott et al., 2008; Doyle and Fitzpatrick, 2010). During brain development, neurotrophic factors induce S-nitrosylation at conserved Cys of HDAC2 in neurons, resulting in changes of histone modification and gene expression (Nott et al., 2008). Upon cardiac hypertrophy, a ROS/TRX-dependent redox switch

of key Cys residues affects nuclear trafficking of a class II HDAC and subsequent gene expression (Ago et al., 2008). Within the large family of HDAC identified in plants (Pandey et al., 2002), members of the class I RPD-3 like HDAC (HDAC9, 19) have been shown to be sensitive to oxidation (Liu et al., 2015; Mengel et al., 2017), but the physiological significance of those modifications is still poorly understood. NO-induced HDAC inhibition is proposed to operate in plant stress response by facilitating the stress-induced transcription of genes (Mengel et al., 2017).

In addition to methylation and acetylation, mammalian histone H3 has been shown to be glutathionylated on a conserved and unique Cys residue (García-Giménez et al., 2014). Histone H3 glutathionylation increases during cell proliferation and decreases during aging. This produces structural changes affecting nucleosome stability and leading to a more open chromatin structure (García-Giménez et al., 2013, 2014, 2017; Xu et al., 2014).

Small RNAs (siRNA and miRNA) are key regulators of gene expression, involved in most developmental and stress response processes in eukaryotic cells (Leisegang et al., 2017). Biogenesis of small RNAs is orchestrated by DICER-LIKE (DCL) and RNASE THREE-LIKE (RTL) endonucleases that process almost every class of double-stranded RNA precursors. Charbonnel et al. (2017) have recently demonstrated that members of DCL and RTL families in *Arabidopsis* are glutathionylated on a conserved Cys which affects their RNase III activity. R-S-SG of RTL1 is reversed by type I GRXs, suggesting that small RNA biogenesis and subsequent gene expression responses are under the control of the cell redox environment (Charbonnel et al., 2017). Indeed, the RNase activity of another member of the family (RTL2) was previously shown to be regulated by its dimerization state through an intermolecular disulfide bond (Comella et al., 2008), showing that a redox switch might regulate small RNA biogenesis.

Epigenetic regulation of gene expression is performed by DNA methylation. Some key metabolic enzymes involved in DNA methylation are suspected to be redox regulated. Among them are enzymes of the S-Adenosyl Methionine (SAM) cycle which provide precursors for DNA and histone methylation (Shen et al., 2016). Other nuclear candidates are the DNA demethylases Repressor of Silencing1 (ROS1) and Demeter-like (DME, DML2, and DML3) enzymes which remove methylated bases from the DNA backbone (Zhu, 2009). All these enzymes contain an iron-sulfur (Fe-S) cluster which might be susceptible to oxidation by ROS. Moreover, different members of the cytosolic Fe-S cluster assembly machinery (i.e., MET18 and AE7) are involved in DNA methylation, likely because they affect the nuclear DNA demethylases Fe-S cluster metabolism (Luo et al., 2012; Duan et al., 2015). Therefore, all these examples show an emerging link between redox regulation and epigenetic regulation.

REFERENCES

Ago, T., Liu, T., Zhai, P., Chen, W., Li, H., Molkentin, J. D., et al. (2008). A redox-dependent pathway for regulating class II HDACs and cardiac hypertrophy. *Cell* 133, 978–993. doi: 10.1016/j.cell.2008.04.041

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Data supporting the role of redox regulation in nuclear functions are rapidly increasing. ROS are key actors of this regulation, influencing gene expression at multiple levels (transcription and post-transcription), notably by modulating activities of transcription regulators. While H₂O₂ has been detected in the nucleus, little is known about ROS metabolism and dynamics in this cell compartment. The recent discovery of a H₂O₂ flux from the chloroplast to the nucleus opens new perspectives to decipher the role of ROS in gene expression. In this way, the identification of a redox regulation of key transcriptional regulators (e.g., transcription factors, HDAC) will shed light on the ways ROS are acting on gene expression. Key for these questions are the proteomic approaches aiming to identify nuclear PTM occurring on redox-sensitive residues, and the structure biology techniques designed to visualize redox-based modifications on protein structure (Waszczak et al., 2014; Parker et al., 2015; Zaffagnini et al., 2016; Pérez-Pérez et al., 2017). While those redox proteome approaches have identified hundreds of nuclear proteins which could be prone to redox modifications, biochemical and functional evidence is missing to support the biological significance of these redox switches. This will be a major challenge for future research in redox biology.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LM, JT-H and J-PR wrote the paper. LM and JT-H performed the figures.

FUNDING

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-Blanc Cynthiol 12-BSV6-0011). LM was supported by a Ph.D. grant from the Université de Perpignan Via Domitia (Ecole Doctorale Energie et Environnement ED305). JT-H was supported by a Ph.D. grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT: 254639/411761).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00705/full#supplementary-material>

Ashtamker, C., Kiss, V., Sagi, M., Davydov, O., and Fluhr, R. (2007). Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* 143, 1817–1826. doi: 10.1104/pp.106.090902

Ball, L., Accotto, G.-P., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A., et al. (2004). Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress

- defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 2448–2462. doi: 10.1105/tpc.104.022608
- Bashandy, T., Taconnat, L., Renou, J.-P., Meyer, Y., and Reichheld, J.-P. (2009). Accumulation of flavonoids in an ntra ntrb mutant leads to tolerance to UV-C. *Mol. Plant* 2, 249–258. doi: 10.1093/mp/ssn065
- Caplan, J. L., Kumar, A. S., Park, E., Padmanabhan, M. S., Hoban, K., Modla, S., et al. (2015). Chloroplast stromules function during innate immunity. *Dev. Cell* 34, 45–57. doi: 10.1016/j.devcel.2015.05.011
- Carmody, M., Crisp, P. A., d'Alessandro, S., Ganguly, D., Gordon, M., Havaux, M., et al. (2016). Uncoupling high light responses from singlet oxygen retrograde signaling and spatial-temporal systemic acquired acclimation. *Plant Physiol.* 171, 1734–1749. doi: 10.1104/pp.16.00404
- Chaki, M., Shekariesfahlan, A., Ageeva, A., Mengel, A., von Toerne, C., Durner, J., et al. (2015). Identification of nuclear target proteins for S-nitrosylation in pathogen-treated *Arabidopsis thaliana* cell cultures. *Plant Sci.* 238, 115–126. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.06.011
- Charbonnel, C., Niazi, A. K., Elvira-Matlot, E., Nowak, E., Zytnicki, M., de Bures, A., et al. (2017). The siRNA suppressor RTL1 is redox-regulated through glutathionylation of a conserved cysteine in the double-stranded-RNA-binding domain. *Nucleic Acids Res.* 45, 11891–11907. doi: 10.1093/nar/gkx820
- Chen, H., Ke, Q., Kluz, T., Yan, Y., and Costa, M. (2006). Nickel ions increase histone H3 lysine 9 dimethylation and induce transgene silencing. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3728–3737. doi: 10.1128/MCB.26.10.3728-3737.2006
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., and Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J.* 90, 856–867. doi: 10.1111/tipj.13299
- Comella, P., Pontvianne, F., Lahmy, S., Vignols, F., Barbezier, N., Debures, A., et al. (2008). Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3'ETS in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 36, 1163–1175. doi: 10.1093/nar/gkm1130
- Comelli, R. N., and Gonzalez, D. H. (2007). Conserved homeodomain cysteines confer redox sensitivity and influence the DNA binding properties of plant class III HD-Zip proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 467, 41–47. doi: 10.1016/j.abb.2007.08.003
- Considine, M. J., and Foyer, C. H. (2014). Redox regulation of plant development. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1305–1326. doi: 10.1089/ars.2013.5665
- Couturier, J., Wu, H.-C., Dhalleine, T., Pégeot, H., Sudre, D., Gualberto, J. M., et al. (2014). Monothiol glutaredoxin-BolA interactions: redox control of *Arabidopsis thaliana* BolA2 and SufE1. *Mol. Plant* 7, 187–205. doi: 10.1093/mp/ss.t156
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 93–109. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.007
- de Simone, A., Hubbard, R., de la Torre, N. V., Velappan, Y., Wilson, M., Considine, M. J., et al. (2017). Redox changes during the cell cycle in the embryonic root meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Antioxid. Redox Signal.* 27, 1505–1519. doi: 10.1089/ars.2016.6959
- Delorme-Hinoux, V., Bangash, S. A. K., Meyer, A. J., and Reichheld, J.-P. (2016). Nuclear thiol redox systems in plants. *Plant Sci.* 243, 84–95. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.12.002
- Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., et al. (2003). The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* 15, 2181–2191. doi: 10.1105/tpc.012849
- Diaz Vivancos, P., Wolff, T., Markovic, J., Pallardó, F. V., and Foyer, C. H. (2010). A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem. J.* 431, 169–178. doi: 10.1042/BJ20100409
- Dickinson, P. J., Kumar, M., Martinho, C., Yoo, S. J., Lan, H., Artavanis, G., et al. (2018). Chloroplast signaling gates thermotolerance in *Arabidopsis*. *Cell Rep.* 22, 1657–1665. doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.054
- Dietz, K.-J. (2014). Redox regulation of transcription factors in plant stress acclimation and development. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1356–1372. doi: 10.1089/ars.2013.5672
- Dietz, K.-J., Mittler, R., and Noctor, G. (2016). Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. *Plant Physiol.* 171, 1535–1539. doi: 10.1104/pp.16.00938
- Dominguez-Solis, J. R., He, Z., Lima, A., Ting, J., Buchanan, B. B., and Luan, S. (2008). A cyclophilin links redox and light signals to cysteine biosynthesis and stress responses in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 16386–16391. doi: 10.1073/pnas.0808204105
- Doyle, K., and Fitzpatrick, F. A. (2010). Redox signaling, alkylation (carbonylation) of conserved cysteines inactivates class I histone deacetylases 1, 2, and 3 and antagonizes their transcriptional repressor function. *J. Biol. Chem.* 285, 17417–17424. doi: 10.1074/jbc.M109.089250
- Duan, C.-G., Wang, X., Tang, K., Zhang, H., Mangrauthia, S. K., Lei, M., et al. (2015). MET18 connects the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway to active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 11:e1005559. doi: 10.1371/journal.pgen.1005559
- Exposito-Rodriguez, M., Laissue, P. P., Yvon-Durocher, G., Smirnov, N., and Mullineaux, P. M. (2017). Photosynthesis-dependent H₂O₂ transfer from chloroplasts to nuclei provides a high-light signalling mechanism. *Nat. Commun.* 8:49. doi: 10.1038/s41467-017-00074-w
- Foyer, C. H., and Noctor, G. (2016). Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect? *Plant Cell Environ.* 39, 951–964. doi: 10.1111/pce.12621
- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T. S., Laloi, C., Minkov, I. N., Shulaev, V., et al. (2006). Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141, 436–445. doi: 10.1104/pp.106.078717
- García-Giménez, J. L., Ibañez-Cabellos, J. S., Seco-Cervera, M., and Pallardó, F. V. (2014). Glutathione and cellular redox control in epigenetic regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 75(Suppl. 1):S3. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.828
- García-Giménez, J. L., Ólaso, G., Hake, S. B., Bönsch, C., Wiedemann, S. M., Markovic, J., et al. (2013). Histone h3 glutathionylation in proliferating mammalian cells destabilizes nucleosomal structure. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1305–1320. doi: 10.1089/ars.2012.5021
- García-Giménez, J. L., Romá-Mateo, C., Pérez-Machado, G., Peiró-Chova, L., and Pallardó, F. V. (2017). Role of glutathione in the regulation of epigenetic mechanisms in disease. *Free Radic. Biol. Med.* 112, 36–48. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.008
- Gibbs, D. J., Lee, S. C., Isa, N. M., Gramuglia, S., Fukao, T., Bassel, G. W., et al. (2011). Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* 479, 415–418. doi: 10.1038/nature10534
- Giesguth, M., Sahm, A., Simon, S., and Dietz, K.-J. (2015). Redox-dependent translocation of the heat shock transcription factor ATHSFA8 from the cytosol to the nucleus in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 589, 718–725. doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.039
- Han, Y., Chaouch, S., Mhamdi, A., Queval, G., Zechmann, B., and 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. doi: 10.1089/ars.2012.5052
- Han, Y., Mhamdi, A., Chaouch, S., and Noctor, G. (2013b). 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
- Heine, G. F., Hernandez, J. M., and Grotewold, E. (2004). Two cysteines in plant R2R3 MYB domains participate in REDOX-dependent DNA binding. *J. Biol. Chem.* 279, 37878–37885. doi: 10.1074/jbc.M405166200
- Holtgreve, S., Gohlke, J., Starmann, J., Druce, S., Klocke, S., Altmann, B., et al. (2008). Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiol. Plant.* 133, 211–228. doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01066.x
- Ito, K., Hanazawa, T., Tomita, K., Barnes, P. J., and Adcock, I. M. (2004). Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 240–245. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.046
- Jung, H.-S., Crisp, P. A., Estavillo, G. M., Cole, B., Hong, F., Mockler, T. C., et al. (2013). Subset of heat-shock transcription factors required for the early response of *Arabidopsis* to excess light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 14474–14479. doi: 10.1073/pnas.1311632110
- Kneeshaw, S., Gelineau, S., Tada, Y., Loake, G. J., and Spoel, S. H. (2014). Selective protein denitrosylation activity of Thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Mol. Cell* 56, 153–162. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.003
- Knuesting, J., Riondet, C., Maria, C., Kruse, I., Bécuwe, N., König, N., et al. (2015). *Arabidopsis* glutaredoxin S17 and its partner, the nuclear factor Y subunit C11/negative cofactor 2 α , contribute to maintenance of the shoot apical meristem under long-day photoperiod. *Plant Physiol.* 167, 1643–1658. doi: 10.1104/pp.15.00049

- Leisegang, M. S., Schröder, K., and Brandes, R. P. (2017). Redox regulation and noncoding RNAs. *Antioxid. Redox Signal.* doi: 10.1089/ars.2017.7276 [Epub ahead of print].
- Li, S., Gutsche, N., and Zachgo, S. (2011). The ROXY1 C-terminal L**LL motif is essential for the interaction with TGA transcription factors. *Plant Physiol.* 157, 2056–2068. doi: 10.1104/pp.111.185199
- Li, S., Lauri, A., Ziemann, M., Busch, A., Bhave, M., and Zachgo, S. (2009). Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21, 429–441. doi: 10.1105/tpc.108.064477
- Licausi, F. (2013). Molecular elements of low-oxygen signaling in plants. *Physiol. Plant.* 148, 1–8. doi: 10.1111/pl.12011
- Licausi, F., Kosmacz, M., Weits, D. A., Giuntoli, B., Giorgi, F. M., Voesenek, L. A., et al. (2011). Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 479, 419–422. doi: 10.1038/nature10536
- Liu, P., Zhang, H., Yu, B., Xiong, L., and Xia, Y. (2015). Proteomic identification of early salicylate- and flg22-responsive redox-sensitive proteins in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* 5:8625. doi: 10.1038/srep08625
- Luo, D., Bernard, D. G., Balk, J., Hai, H., and Cui, X. (2012). The DUF59 family gene *AE7* acts in the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway to maintain nuclear genome integrity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 4135–4148. doi: 10.1105/tpc.112.102608
- Marchal, C., Delorme-Hinoux, V., Bariat, L., Siala, W., Belin, C., Saez-Vasquez, J., et al. (2014). NTR/NRX define a new thioredoxin system in the nucleus of *Arabidopsis thaliana* cells. *Mol. Plant* 7, 30–44. doi: 10.1093/mp/sst162
- 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
- Mengel, A., Ageeva, A., Georgii, E., Bernhardt, J., Wu, K., Durner, J., et al. (2017). Nitric oxide modulates histone acetylation at stress genes by inhibition of histone deacetylases. *Plant Physiol.* 173, 1434–1452. doi: 10.1104/pp.16.01734
- Meyer, Y., Belin, C., Delorme-Hinoux, V., Reichheld, J.-P., and Riondet, C. (2012). Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 1124–1160. doi: 10.1089/ars.2011.4327
- Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F., and Reichheld, J.-P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu. Rev. Genet.* 43, 335–367. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134201
- Miller, G., and Mittler, R. (2006). Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann. Bot.* 98, 279–288. doi: 10.1093/aob/mcl107
- Møller, I. M., Jensen, P. E., and Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 459–481. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946
- Montacié, C., Durut, N., Opsomer, A., Palm, D., Comella, P., Picart, C., et al. (2017). Nucleolar proteome analysis and proteasomal activity assays reveal a link between nucleolus and 26S proteasome in *A. thaliana*. *Front. Plant Sci.* 8:1815. doi: 10.3389/fpls.2017.01815
- Montrichard, F., Alkhalifou, F., Yano, H., Vensel, W. H., Hurkman, W. J., and Buchanan, B. B. (2009). Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J. Proteomics* 72, 452–474. doi: 10.1016/j.jprot.2008.12.002
- Morisse, S., Zaffagnini, M., Gao, X.-H., Lemaire, S. D., and Marchand, C. H. (2014). Insight into protein S-nitrosylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1271–1284. doi: 10.1089/ars.2013.5632
- Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935–944. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00429-X
- Murmu, J., Bush, M. J., DeLong, C., Li, S., Xu, M., Khan, M., et al. (2010). *Arabidopsis* basic leucine-zipper transcription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development. *Plant Physiol.* 154, 1492–1504. doi: 10.1104/pp.110.159111
- Niu, Y., DesMarais, T. L., Tong, Z., Yao, Y., and Costa, M. (2015). Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation. *Free Radic. Biol. Med.* 82, 22–28. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.028
- Noctor, G. (2017). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013 [Epub ahead of print].
- Noctor, G., and Foyer, C. H. (2016). Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiol.* 171, 1581–1592. doi: 10.1104/pp.16.00346
- Nott, A., Watson, P. M., Robinson, J. D., Crepaldi, L., and Riccio, A. (2008). S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodeling in neurons. *Nature* 455, 411–415. doi: 10.1038/nature07238
- Palm, D., Simm, S., Darm, K., Weis, B. L., Ruprecht, M., Schleiff, E., et al. (2016). Proteome distribution between nucleoplasm and nucleolus and its relation to ribosome biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *RNA Biol.* 13, 441–454. doi: 10.1080/15476286.2016.1154252
- Pandey, R., Müller, A., Napoli, C. A., Selinger, D. A., Pikaard, C. S., Richards, E. J., et al. (2002). Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 30, 5036–5055.
- Park, S.-W., Li, W., Viehhauser, A., He, B., Kim, S., Nilsson, A. K., et al. (2013). Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytyldienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 9559–9564. doi: 10.1073/pnas.1218872110
- Parker, J., Balmant, K., Zhu, F., Zhu, N., and Chen, S. (2015). cysTMTRAQ—An integrative method for unbiased thiol-based redox proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 237–242. doi: 10.1074/mcp.O114.041772
- Pérez-Pérez, M. E., Mauriès, A., Maes, A., Tourasse, N. J., Hamon, M., Lemaire, S. D., et al. (2017). The deep thioredoxome in *Chlamydomonas reinhardtii*: new insights into redox regulation. *Mol. Plant* 10, 1107–1125. doi: 10.1016/j.molp.2017.07.009
- Qin, L., Wang, M., Zuo, J., Feng, X., Liang, X., Wu, Z., et al. (2015). Cytosolic BoLA plays a repressive role in the tolerance against excess iron and MV-induced oxidative stress in plants. *PLoS One* 10:e0124887. doi: 10.1371/journal.pone.0124887
- Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoerberichts, F. A., Vandorpe, M., Gakière, B., Vanacker, H., et al. (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. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03263.x
- Rahantaniaina, M.-S., Li, S., Chatel-Innocenti, G., Tuzet, A., Issakidis-Bourguet, E., Mhamdi, A., et al. (2017). Cytosolic and chloroplastic DHARs cooperate in oxidative stress-driven activation of the salicylic acid pathway. *Plant Physiol.* 174, 956–971. doi: 10.1104/pp.17.00317
- Rodrigues, O., Reshetnyak, G., Grondin, A., Saijo, Y., Leonhardt, N., Maurel, C., et al. (2017). Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA- and pathogen-triggered stomatal closure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 9200–9205. doi: 10.1073/pnas.1704754114
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Sanz-Fernández, M., Hu, J., and Sandalio, L. M. (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. doi: 10.1104/pp.16.00648
- Roschztardt, H., Grillet, L., Isaure, M.-P., Conéjéro, G., Ortega, R., Curie, C., et al. (2011). Plant cell nucleolus as a hot spot for iron. *J. Biol. Chem.* 286, 27863–27866. doi: 10.1074/jbc.C111.269720
- Rouhier, N., Cerveau, D., Couturier, J., Reichheld, J.-P., and Rey, P. (2015). Involvement of thiol-based mechanisms in plant development. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 1479–1496. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.01.023
- Saez-Vasquez, J., and Medina, F. J. (2009). The plant nucleolus. *Adv. Bot. Res.* 47, 1–46.
- Sarkar, N., Lemaire, S., Wu-Scharf, D., Issakidis-Bourguet, E., and Cerutti, H. (2005). Functional specialization of *Chlamydomonas reinhardtii* cytosolic thioredoxin h1 in the response to alkylation-induced DNA damage. *Eukaryot. Cell* 4, 262–273. doi: 10.1128/EC.4.2.262-273.2005
- Schnaubelt, D., Queval, G., Dong, Y., Diaz-Vivancos, P., Makgopa, M. E., Howell, G., et al. (2015). Low glutathione regulates gene expression and the redox potentials of the nucleus and cytosol in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 38, 266–279. doi: 10.1111/pce.12252
- Serrato, A. J., and Cejudo, F. J. (2003). Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta* 217, 392–399. doi: 10.1007/s00425-003-1009-4
- Serrato, A. J., Crespo, J. L., Florencio, F. J., and Cejudo, F. J. (2001). Characterization of two thioredoxins h with predominant localization in the

- nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. *Plant Mol. Biol.* 46, 361–371. doi: 10.1023/A:1010697331184
- Shaikhali, J., Heiber, I., Seidel, T., Ströher, E., Hiltcher, H., Birkmann, S., et al. (2008). The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes. *BMC Plant Biol.* 8:48. doi: 10.1186/1471-2229-8-48
- Shaikhali, J., Norén, L., de Dios Barajas-López, J., Srivastava, V., König, J., Sauer, U. H., et al. (2012). Redox-mediated mechanisms regulate DNA binding activity of the G-group of basic region leucine zipper (bZIP) transcription factors in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 287, 27510–27525. doi: 10.1074/jbc.M112.361394
- Shaikhali, J., and Wingsle, G. (2017). Redox-regulated transcription in plants: emerging concepts. *AIMS Mol. Sci.* 4, 301–338. doi: 10.3934/molsci.2017.3.301
- Shen, Y., Issakidis-Bourguet, E., and Zhou, D.-X. (2016). Perspectives on the interactions between metabolism, redox, and epigenetics in plants. *J. Exp. Bot.* 67, 5291–5300. doi: 10.1093/jxb/erw310
- Sies, H., Berndt, C., and Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 715–748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., and Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 35, 259–270. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajeroska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., et al. (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321, 952–956. doi: 10.1126/science.1156970
- Tavares, C. P., Vernal, J., Delena, R. A., Lamattina, L., Cassia, R., and Terenzi, H. (2014). S-nitrosylation influences the structure and DNA binding activity of AtMYB30 transcription factor from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* 1844, 810–817. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.02.015
- Testard, A., Da Silva, D., Ormancey, M., Pichereaux, C., Pouzet, C., Jauneau, A., et al. (2016). Calcium- and nitric oxide-dependent nuclear accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in response to long chain bases in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 57, 2221–2231. doi: 10.1093/pcp/pcw137
- Van Ruyskensvelde, V., Van Breusegem, F., and Van Der Kelen, K. (2018). Post-transcriptional regulation of the oxidative stress response in plants. *Free Radic. Biol. Med.* doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.032 [Epub ahead of print].
- Vescovi, M., Zaffagnini, M., Festa, M., Trost, P., Lo Schiavo, F., and Costa, A. (2013). Nuclear accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cadmium-stressed *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 162, 333–346. doi: 10.1104/pp.113.215194
- Vivancos, P. D., Dong, Y., Ziegler, K., Markovic, J., Pallardó, F. V., Pellny, T. K., et al. (2010). Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *Plant J.* 64, 825–838. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04371.x
- Vogel, M. O., Moore, M., König, K., Pecher, P., Alsharafa, K., Lee, J., et al. (2014). Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26, 1151–1165. doi: 10.1105/tpc.113.12.1061
- Wagner, D., Przybyla, D., Op den Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, K. P., et al. (2004). The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 306, 1183–1185. doi: 10.1126/science.1103178
- Waszczak, C., Akter, S., Eeckhout, D., Persiau, G., Wahni, K., Bodra, N., et al. (2014). Sulfenome mining in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 11545–11550. doi: 10.1073/pnas.1411607111
- Waszczak, C., Akter, S., Jacques, S., Huang, J., Messens, J., and Van Breusegem, F. (2015). Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *J. Exp. Bot.* 66, 2923–2934. doi: 10.1093/jxb/erv084
- Welsch, R., Maass, D., Voegel, T., Dellapenna, D., and Beyer, P. (2007). Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 145, 1073–1085. doi: 10.1104/pp.107.104828
- Willems, P., Mhamdi, A., Stael, S., Storme, V., Kerchev, P., Noctor, G., et al. (2016). The ROS wheel: refining ROS transcriptional footprints. *Plant Physiol.* 171, 1720–1733. doi: 10.1104/pp.16.00420
- Williams, C. E., and Grotewold, E. (1997). Differences between plant and animal Myb domains are fundamental for DNA binding activity, and chimeric Myb domains have novel DNA binding specificities. *J. Biol. Chem.* 272, 563–571. doi: 10.1074/jbc.272.1.563
- Wu, Q., Lin, J., Liu, J.-Z., Wang, X., Lim, W., Oh, M., et al. (2012). Ectopic expression of *Arabidopsis* glutaredoxin AtGRXS17 enhances thermotolerance in tomato. *Plant Biotechnol. J.* 10, 945–955. doi: 10.1111/j.1467-7652.2012.00723.x
- Xiang, C., and Oliver, D. J. (1998). Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1539–1550. doi: 10.1105/tpc.10.9.1539
- Xing, S., Rosso, M. G., and Zachgo, S. (2005). ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 132, 1555–1565. doi: 10.1242/dev.01725
- Xing, S., and Zachgo, S. (2008). ROXY1 and ROXY2, two *Arabidopsis* glutaredoxin genes, are required for anther development. *Plant J.* 53, 790–801. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03375.x
- Xu, Y.-M., Du, J.-Y., and Lau, A. T. Y. (2014). Posttranslational modifications of human histone H3: an update. *Proteomics* 14, 2047–2060. doi: 10.1002/pmic.201300435
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Marchand, C. H., Morisse, S., Trost, P., and Lemaire, S. D. (2012). Redox regulation in photosynthetic organisms: focus on glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 567–586. doi: 10.1089/ars.2011.4255
- Zaffagnini, M., De Mia, M., Morisse, S., Di Giacinto, N., Marchand, C. H., Maes, A., et al. (2016). Protein S-nitrosylation in photosynthetic organisms: a comprehensive overview with future perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 952–966. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.02.006
- Zaffagnini, M., Fermani, S., Costa, A., Lemaire, S. D., and Trost, P. (2013). Plant cytoplasmic GAPDH: redox post-translational modifications and moonlighting properties. *Front. Plant Sci.* 4:450. doi: 10.3389/fpls.2013.00450
- Zechmann, B. (2017). Compartment-specific importance of ascorbate during environmental stress in plants. *Antioxid. Redox Signal.* doi: 10.1089/ars.2017.7232 [Epub ahead of print].
- Zechmann, B., Mauch, F., Sticher, L., and Müller, M. (2008). Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *J. Exp. Bot.* 59, 4017–4027. doi: 10.1093/jxb/ern243
- Zechmann, B., and Müller, M. (2010). Subcellular compartmentation of glutathione in dicotyledonous plants. *Protoplasma* 246, 15–24. doi: 10.1007/s00709-010-0111-2
- Zechmann, B., Stumpe, M., and Mauch, F. (2011). Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta* 233, 1–12. doi: 10.1007/s00425-010-1275-x
- Zhang, H., Zhao, Y., and Zhou, D.-X. (2017). Rice NAD⁺-dependent histone deacetylase OsSRT1 represses glycolysis and regulates the moonlighting function of GAPDH as a transcriptional activator of glycolytic genes. *Nucleic Acids Res.* 45, 12241–12255. doi: 10.1093/nar/gkx825
- Zhou, X., Sun, H., Chen, H., Zavadil, J., Kluz, T., Arita, A., et al. (2010). Hypoxia induces trimethylated H3 lysine 4 by inhibition of JARID1A demethylase. *Cancer Res.* 70, 4214–4221. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2942
- Zhou, X., Sun, H., Ellen, T. P., Chen, H., and Costa, M. (2008). Arsenite alters global histone H3 methylation. *Carcinogenesis* 29, 1831–1836. doi: 10.1093/carcin/bgn063
- Zhu, J.-K. (2009). Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* 43, 143–166. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134205

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.

Copyright © 2018 Martins, Trujillo-Hernandez and Reichheld. 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) and the copyright owner 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.

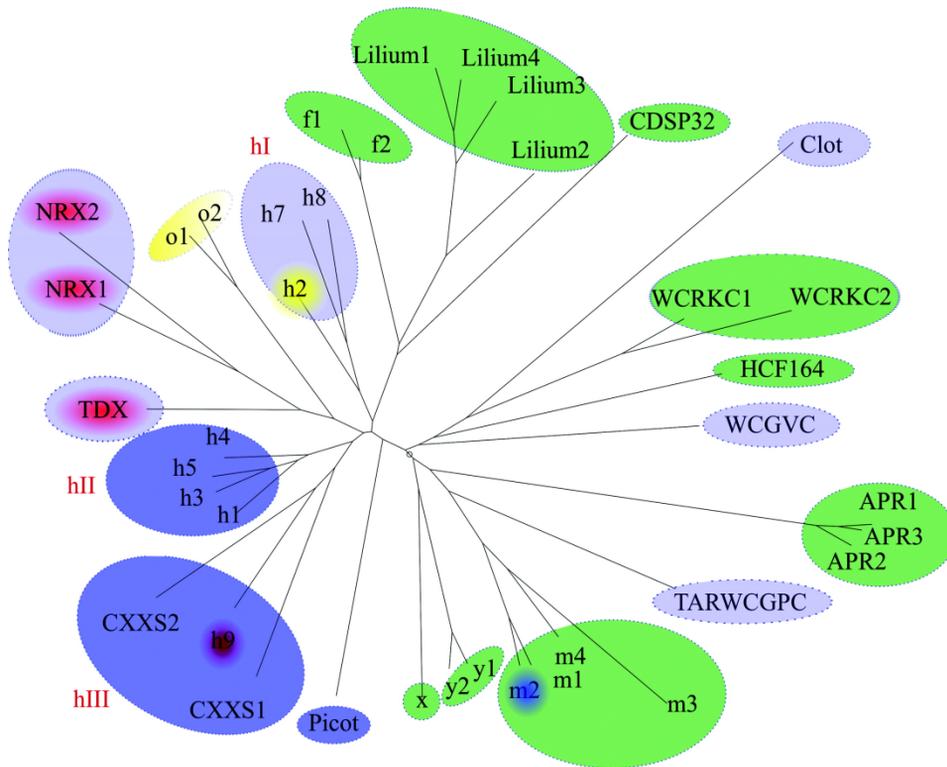


Figure 20 : Arbre phylogénique des TRX d'*Arabidopsis thaliana*.

Les membres des différents sous-groupes de TRX (15 au total) sont classés en cluster et la localisation cellulaire est représentée par différentes couleurs. La couleur verte correspond aux chloroplastes, bleu au cytosol, jaune aux mitochondries, rouge au noyau, et bordeaux à la membrane. Un cercle de couleur dégradé indique une double localisation. Le cercle de couleur gris représente une localisation putative. Modifiée de Meyer et al., 2012.

V.2 Les TRX chez les plantes :

Chez les plantes, les TRX ont d'abord été identifiées comme des régulateurs de la photosynthèse par l'étude d'enzymes chloroplastiques impliquées dans le métabolisme du carbone telles que la FBPase et la MDH (Meyer et al., 2012). Il a été montré que ces enzymes sont activées par une TRX chloroplastique. La réduction de ces enzymes métaboliques impacte leur conformation et les rend actives (décrit dans la partie IV.2.2.1).

Les TRX des plantes vasculaires sont très nombreuses en comparaison aux autres règnes (deux chez *Escherichia coli* et les mammifères, trois chez *Saccharomyces cerevisiae*). Elles sont classées en 15 sous-groupes de plusieurs membres (Figure 20) (Vlamis-Gardikas and Holmgren, 2002; Meyer et al., 2012; Geigenberger et al., 2017). Les TRX de ces sous-groupes se retrouvent également dans tous les génomes de plantes vasculaires qui ont été séquencés et certaines sont présentes chez les bryophytes, les lycophytes, les algues eucaryotes et les cyanobactéries (Chibani et al., 2009). Parmi les 15 sous-groupes, il y a les TRX typiques de 10 à 12 kDa, avec un site actif de type WCG/PPC qui sont généralement réduites par les TRX réductases. *Arabidopsis thaliana* contient 20 isoformes de TRX différentes (Figure 20). Il y a les TRX f1-2, m1-4, x, y1-2 et z plastidiales et les TRX o1-2 dans la mitochondrie et le noyau, tandis que les huit représentants de TRXh sont répartis entre le cytosol, le noyau, le RE et les mitochondries (Meyer et al., 2012; Delorme-Hinoux et al., 2016; Geigenberger et al., 2017). Il y a également, des protéines de type TRX aux propriétés atypiques au niveau du site actif, du nombre de domaines TRX ou un domaine TRX associé à d'autres domaines (Meyer et al., 2012). Une partie de ces TRX de type TRX-like ne sont pas bien caractérisées au niveau de leur activité et du système de réduction. L'ensemble des TRX présente des rôles très diversifiés dans la plante. Elles sont impliquées dans le métabolisme, dans l'expression des gènes, dans la croissance, dans le développement lors de conditions variables de l'environnement (Geigenberger et al., 2017). Par exemple, le système mitochondrial contribue à la réponse du métabolisme face à des épisodes de sécheresse (da Fonseca-Pereira et al., 2018). Elles sont également impliquées dans la fertilité et la résistance aux pathogènes (Marchal et al., 2014; Kneeshawa et al., 2017). Enfin, les isoformes TRXo mitochondriaux se lient à un cœur Fe-S et réduisent les protéines NFU *in vitro*, protéines impliquées dans la maturation des cœurs Fe-S (Zannini et al., 2018).

Dans les chloroplastes, les TRX sont réduites par le système ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR) et par la thiorédoxine réductase dépendante du NADPH C (NTRC) (Wolosiuk and Buchanan, 1978; Schürmann and Buchanan, 2008). Dans la mitochondrie, le cytoplasme et le noyau, les TRX

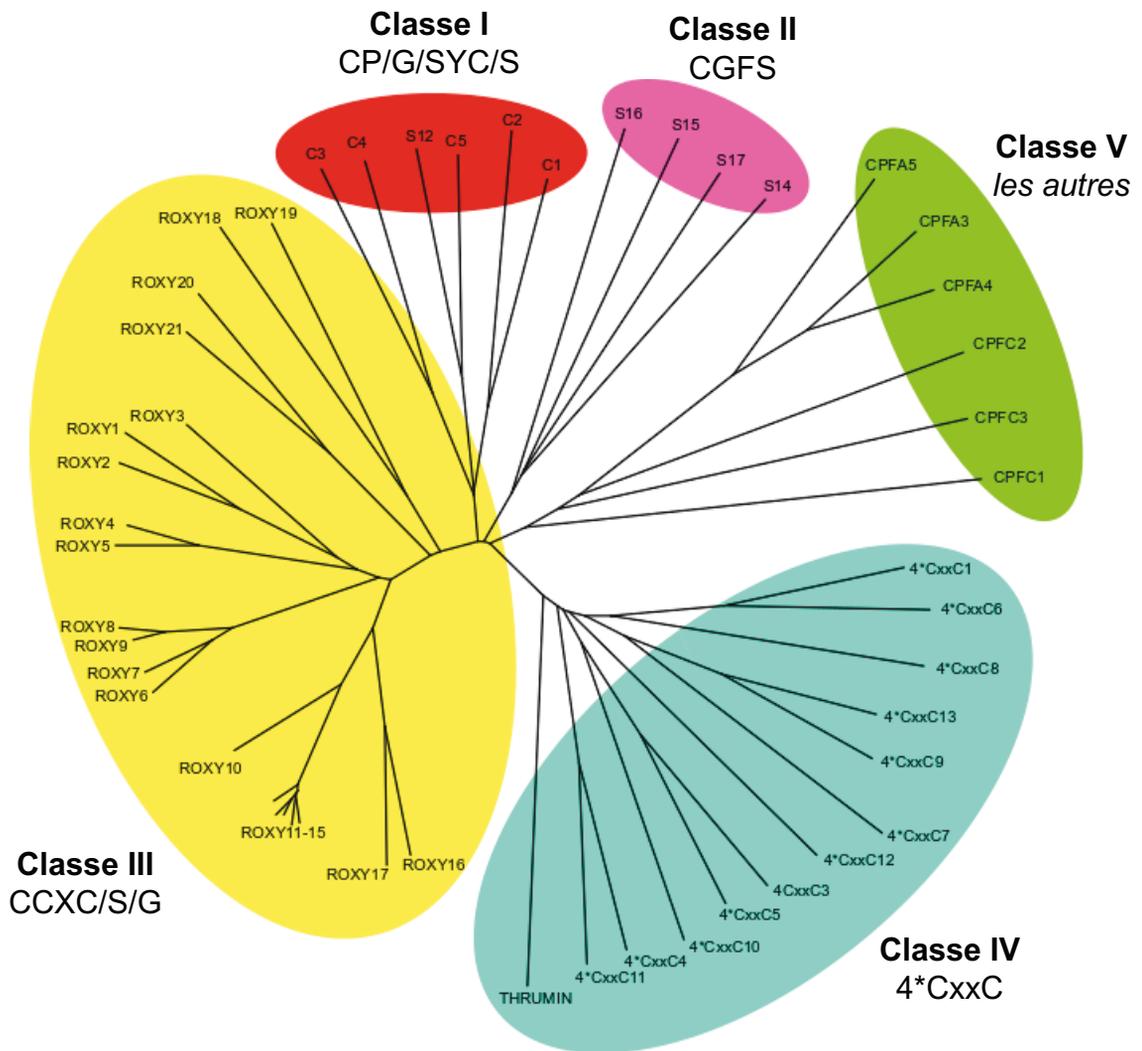


Figure 21 : Arbre phylogénique des GRX d'*Arabidopsis thaliana*.

Les membres de la grande famille des GRX sont classés en 5 classes. Les classes I et II sont composées de respectivement 6 et 4 GRX et possèdent respectivement CPXC et CGFS comme sites actifs. Les 21 GRX cytosoliques de classe III appelées ROXY ont, quant à elles, un motif CCXC/S/G. Les 13 GRX de la classe IV sont composées de 3 domaines : un domaine N-terminal GRX avec un site actif de type CXXC répété 4 fois et suivi de 2 domaines aux fonctions inconnues. Enfin, la classe V est composée de 6 GRX localisées dans le cytosol, la mitochondrie et le chloroplaste et présentant un site actif dicystéinique CPFC ou monocystéinique CFPS. Modifiée de Meyer et al., 2012.

sont réduites par le système NTR (Figure 17) (Jacquot et al., 1994; Rivera-Madrid et al., 1995; Laloï et al., 2001). Le système FTR est présent uniquement dans les plastides (Schürmann and Buchanan, 2008). La FTR est une protéine à cœur Fe-S de type [4Fe-4S] qui est importante pour sa fonction de réduction des TRX (Chow et al., 1995). Elle est composée d'une sous-unité catalytique contenant le cœur fer-soufre, deux résidus cystéines pouvant former un pont disulfure et d'une autre sous-unité variant selon les espèces (Staples et al., 1996, 1998). Chez *Arabidopsis thaliana*, *FTRB* produit la sous-unité catalytique et *FTRA1* et *FTRA2* codent deux isoformes de la seconde sous-unité régulatrice (Keryer et al., 2004). La voie de réduction dans laquelle intervient NTR existe également chez les plantes (Meyer et al., 2012; Delorme-Hinoux et al., 2016). La NTR de plante est très similaire à la NTR d'*E. Coli* (Jacquot et al., 1994). La forme active est composée d'un homodimère associé à une flavine. *Arabidopsis thaliana* possède deux gènes NTR issus d'un récent événement de duplication (Blanc et al., 2000; Reichheld et al., 2005). NTRA produit un court ARNm qui code pour une protéine cytosolique et un long ARNm qui code un précurseur d'une protéine mitochondriale (Laloï et al., 2001). NTRB possède également deux ARNm qui codent une protéine pour ces deux organites (Reichheld et al., 2005).

V.3 Les GRX chez les plantes :

V.3.1 Présentation des GRX de plantes :

Les glutarédoxines sont des protéines qui agissent comme des réductases et qui sont dépendantes du glutathion (Laurent et al., 1964). Elles ont une structure caractéristique et un repliement conservé, le repliement thiorédoxine. Ce repliement est constitué par un pli central antiparallèle à quatre brins de feuillet β entourés de trois hélices α . Elles présentent également un site actif de type CXXC ou CXXS et un site de liaison spécifique pour le glutathion. Comme pour les TRX, les plantes supérieures ont un nombre élevé de GRX par rapport aux autres organismes. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe 50 GRX qui sont codées par une famille multigénique divisée en cinq classes (Figure 21) (Couturier et al., 2009; Meyer et al., 2012).

La classe I et la classe II sont composées de respectivement 6 et 4 GRX présentes dans tous les organismes photosynthétiques et elles possèdent respectivement CP/G/SYC/S et CGFS comme sites actifs. Certaines sont capables d'incorporer un cœur Fe-S (se référer à la partie V3.3.3). Quatre GRX de la classe I sont cytosoliques/nucléaires (C1, C2, C3 et C4) et deux sont plastidiales (C5 et C12) (Riondet et al., 2012; Couturier et al., 2009). La plupart d'entre elles ont des activités de

déglutathionylation. Ces GRX sont biochimiquement bien caractérisées chez *Arabidopsis thaliana* et chez le peuplier (Rouhier et al., 2007; Couturier et al., 2011; Riondet et al., 2012; Zaffagnini et al., 2012a; Bender et al., 2015). Par exemple, il a été montré *in vitro* qu'AtGRXC2 régule l'activité de la kinase 1 de type récepteur apparentée à BRI1 (BAK1) par un mécanisme de (de)glutathionylation (Bender et al., 2015). La classe II est composée de deux GRX chloroplastiques, une mitochondriale et une GRX avec une double localisation cytosolique et nucléaire (se référer au VI.). Les 21 GRX cytosoliques de classe III appelées ROXY ont, quant à elles, un motif CCx[C/S/G] et sont présentes dans les plantes terrestres uniquement (Meyer et al., 2012; Gutsche et al., 2015). Elles sont exprimées dans la plupart des tissus de la plante (Gutsche et al., 2015). Ces protéines sont notamment impliquées dans le développement (notamment ROXY1 et 2, décrit dans la partie suivante) et dans la réponse aux pathogènes (notamment ROXY18 et 19) (Gutsche et al., 2015). Les GRX de la classe IV sont présentes chez les plantes terrestres mais aussi les algues vertes (Navrot et al., 2006; Meyer et al., 2006). Elles sont assez atypiques car elles sont composées de trois domaines : un domaine N-terminal GRX avec un site actif de type CXXC répété 4 fois suivi de deux domaines aux fonctions inconnues. Dans une récente étude, les auteurs les présentent comme des protéines DNAJ related proteins (Pulido and Leister, 2018). Le nombre de GRX dans ces dernières classes (III et IV) n'est pas le même dans les différentes espèces de plantes. Les GRX de la classe IV ont été peu étudiées. Un de ces membres, la THRUMIN1 pourrait être responsable du mouvement des chloroplastes puisqu'elle a été retrouvée dans un crible génétique qui visait à sélectionner des mutants affectés dans le déplacement des chloroplastes (Whippo et al., 2011). Enfin, la classe V est composée de 6 GRX localisées dans le cytosol, la mitochondrie et le chloroplaste et présentant un site actif dicystéinique CPFC ou monocystéinique CFPS (Meyer et al., 2012). Peu de données sont disponibles sur les membres de ce groupe. Basées sur des homologies de séquences, quatre membres ont des homologues proches chez le blé qui ont la capacité de déglutathionyler des flavonoïdes. Ces 4 membres sont également classés comme glutathion S-transférases de type lambda (GSTL) (Dixon and Edwards, 2010).

Les GRX sont réduites par le système NADPH/GR/GSH (Figure 17). Le glutathion oxydé (GSSG) est réduit par la glutathion réductase (GR) et la GR va être elle-même réduite par le NADPH. Chez les plantes, deux gènes codent pour une GR, il s'agit de *GRI* et *GR2*. *GRI* code une protéine cytosolique et une protéine peroxysomale, et *GR2* code pour un précurseur ciblant à la fois le chloroplaste et la mitochondrie (Creissen, 1999; Chew et al., 2003; Kataya and Reumann, 2010; Trivedi et al., 2013).

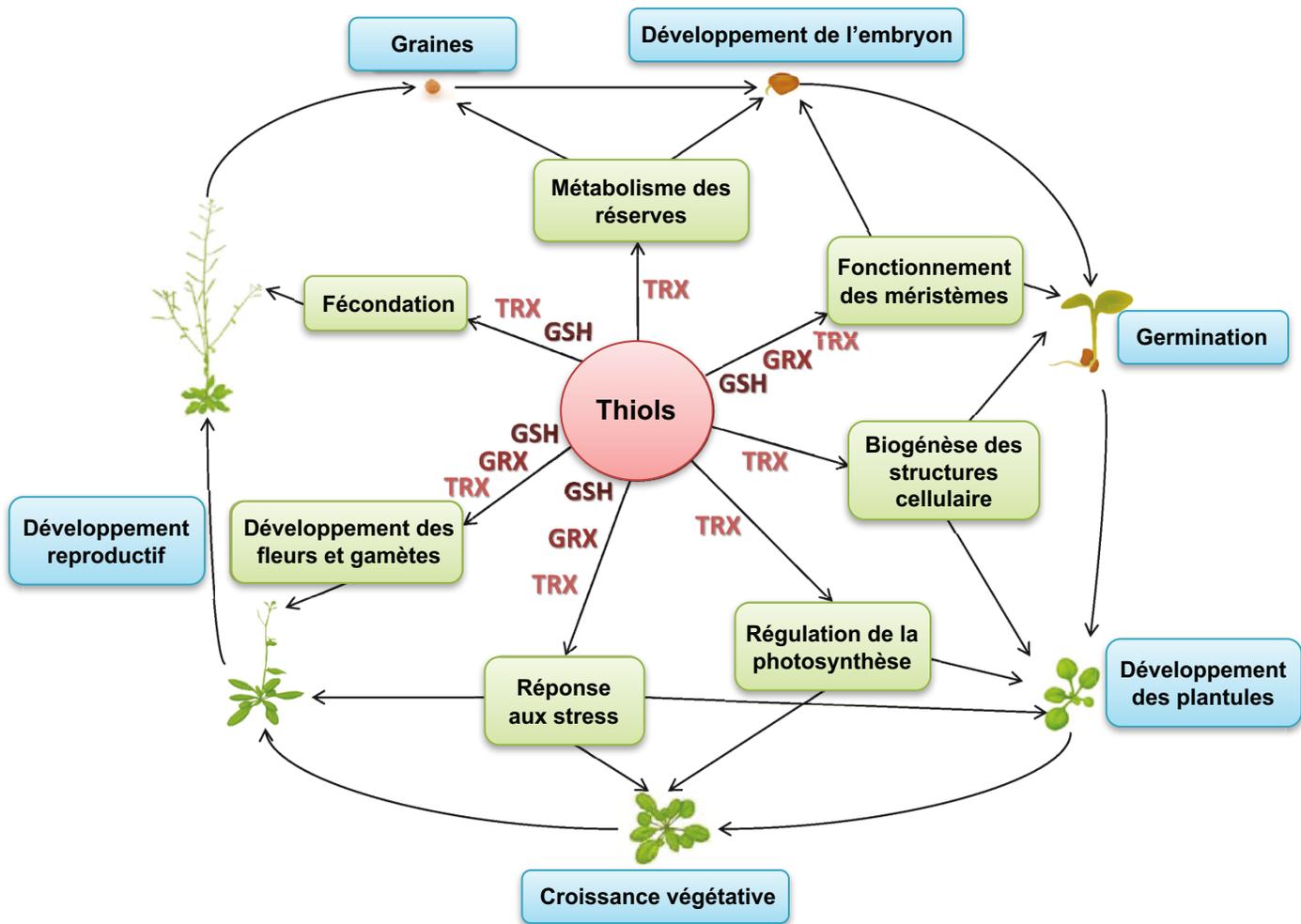


Figure 22 : Les nombreuses fonctions de GSH, TRX et GRX dans le cycle de développement de la plante.

De la graine au développement reproductif, le glutathion, les thiorédoxines et les glutarédoxines jouent des rôles importants. Tous les trois interviennent dans le fonctionnement des méristèmes, dans la réponse aux stress et dans le développement des fleurs et des gamètes. Certaines TRX sont impliquées dans la fécondation comme le GSH, dans le métabolisme des réserves, dans la biogénèse des structures cellulaires et dans la régulation de la photosynthèse. Modifiée de Rouhier et al., 2015.

V.3.2 Le rôle des GRX dans le développement de la plante et la réponse aux stress :

Une partie de cette introduction a été consacrée au développement des plantes et à la réponse aux stress thermiques. Les systèmes rédoxines et les ROS sont des acteurs importants de ces deux voies. De nombreuses études indiquent que l'homéostasie redox cellulaire façonne le développement des plantes et que les ROS, les thiorédoxines, le glutathion, les glutarédoxines et les autres composés redox remplissent des rôles clés dans la régulation de la croissance et du développement des racines (Figure 22) (Considine and Foyer, 2014; Schippers et al., 2012; Rouhier et al., 2015).

Les ROS, le glutathion et les thiorédoxines ont des rôles respectifs dans la fonction des méristèmes, dans la croissance des organes latéraux et dans le développement floral (Rouhier et al., 2015; Schippers et al., 2016). Les changements dans les niveaux de ROS et/ou d'oxygène influencent la croissance de la cellule, et l'ensemble pourrait être lié à la signalisation hormonale et aux réseaux transcriptionnels décrits dans la partie I.

Chez deux GRX de classe I d'*Arabidopsis thaliana*, GRXC1 et GRXC2, la double mutation est embryon-létale car ces protéines sont essentielles au développement de l'embryon (Riondet et al., 2012). Des membres de la classe II sont également impliqués dans le développement des plantes et la réponse aux stress (détaillés dans les parties VI. et VII.). Le rôle des GRX dans le développement des plantes, notamment des organes floraux, a été décrit pour certains membres de la classe III, rôle qui est conservé chez les mono- et les dicotylédones. Certaines GRX telles que ROXY1 sont requises, en interaction avec des facteurs de transcription de type Leucine zipper TGA comme PAN, dans le développement reproductif (Xing and Zachgo, 2008; Murmu et al., 2010; Li et al., 2009). Chez *Arabidopsis thaliana*, le mutant *roxy1* présente un nombre réduit de primordia foliaires et des anomalies dans la morphogénèse des pétales. Une cystéine située dans le site catalytique de ROXY1 est importante pour cette fonction physiologique (Xing et al., 2005). ROXY1 participe également à la régulation négative d'AGAMOUS dans le développement des sépales et des pétales, cette dernière étant importante au développement des deux autres composés de la fleur (étamines et carpelles). Le mutant *roxy2* ne présente pas de défaut dans le développement de la fleur contrairement au double mutant *roxy1roxy2* qui a un nombre réduit de pétales et qui est stérile car il ne produit pas de pollen (Xing and Zachgo, 2008). Récemment, il a été montré que ROXY1 interagissait avec PETAL LOSS (PTL) pour limiter la croissance à l'intérieur et entre les sépales et pour promouvoir l'initiation de pétales (Quon et al., 2017). Dans la même classe, ROXY4 qui est régulée par la protéine DELLA RGA, participerait à la signalisation des gibbérellines et au développement des organes floraux (Hou et al., 2008). Plusieurs GRX issues de la classe III, telles que GRXS13 (aussi appelée ROXY18),

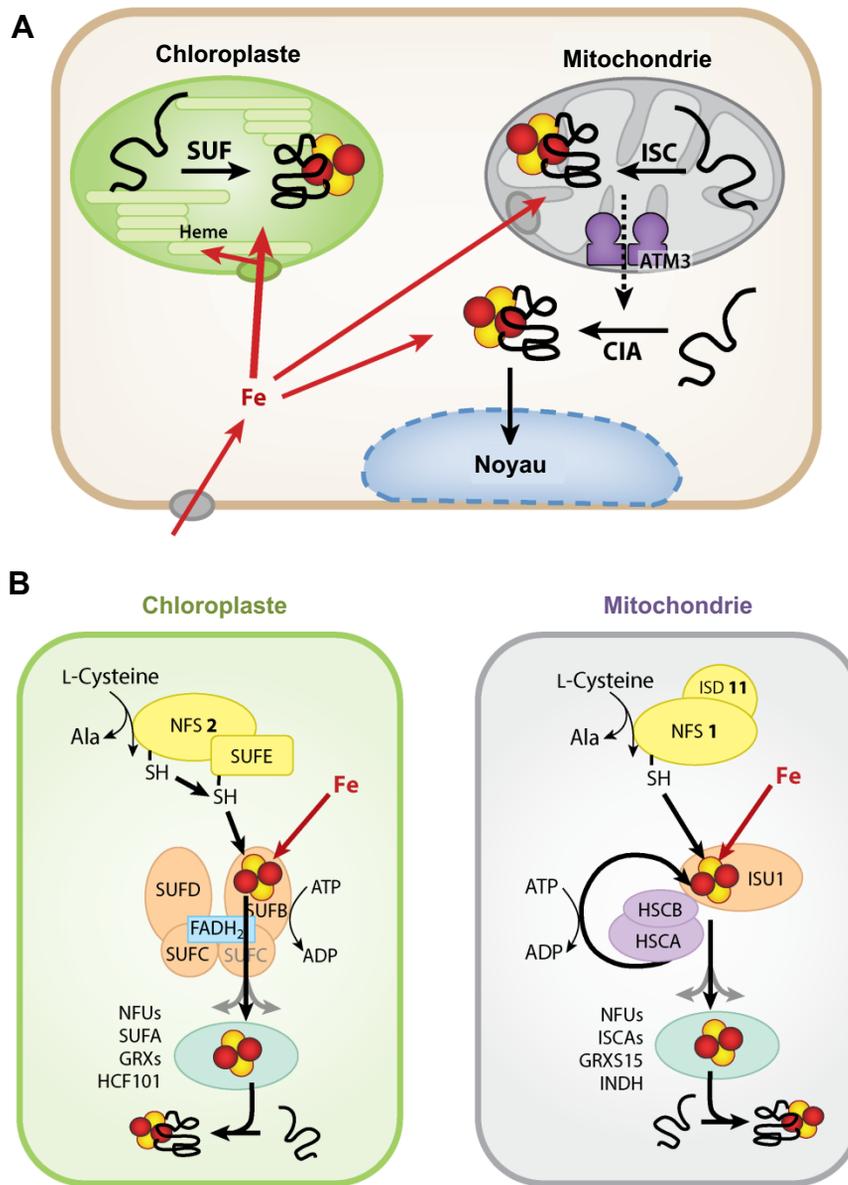


Figure 23 : Aperçu des voies d'assemblage des cœurs Fe-S dans les cellules végétales.

(A) Voies d'assemblage des cœurs Fe-S dans les chloroplastes (SUF), dans les mitochondries (ISC) et la voie d'assemblage cytosolique de protéines fer-soufre (CIA). Le fer (rouge) pénètre dans la cellule via la membrane plasmique et est ensuite réparti entre les différentes voies d'assemblage. La quantité de fer attribuée à chaque voie d'assemblage dépend des besoins de la cellule. Dans les feuilles, la plupart du fer va aux chloroplastes (flèche plus épaisse). L'assemblage des protéines Fe-S dans le cytosol dépend du transporteur ATM3 qui transporte un composé inconnu de la mitochondrie au cytosol. (B) Les différentes étapes d'assemblage des cœurs Fe-S des voies SUF et ISC. Après l'assemblage du cluster sur les protéines d'échafaudage (SUFBCD et ISU1), le cœur peut être transféré à différentes protéines porteuses (NFU, etc.) jusqu'à ce que le cœur soit transféré à une protéine qui en a besoin pour son activité. Les deux systèmes ont également besoin d'électrons et de donneurs d'électrons, mais pour des raisons de simplicité, ils ne sont pas décrits. Modifiée de Balk and Schaedler, 2014

participent également à la tolérance de certains stress biotiques et abiotiques (Ndamukong et al., 2007; La Camera et al., 2011; Zander et al., 2012; Laporte et al., 2012). Cette protéine est importante dans la défense face à l'attaque de pathogènes et dans la résistance au stress photo-oxydatif. A noter que ce mutant *grxs13* présente également un défaut de croissance dans des conditions optimales de croissance (Laporte et al., 2012).

V.3.3 Les Glutarédoxines et les cœurs Fer-Soufre :

V.3.3.1 Les cœurs fer-soufre (Fe-S) :

Une partie du fer intracellulaire végétal est incorporée dans des groupements fer-soufre (Fe-S) qui peuvent être des cofacteurs de réactions de transfert d'électrons et qui sont souvent essentiels à la fonction catalytique d'enzymes (Balk and Schaedler, 2014). Il existe plusieurs types de cœurs Fe-S : les cœurs à [2Fe-2S] et à [4Fe-4S] (mais aussi [3Fe-4S] et [8Fe-7S] nitrogénase). Des protéines d'assemblage sont nécessaires pour la délivrance du soufre qui se trouve sous forme de persulfide (S₀), qui va être réduit en sulfide (S²⁻). Le pré-assemblage avec le fer se fait sur une protéine d'échafaudage. Ce cœur Fe-S est ensuite transféré vers une protéine cible avec l'aide d'ATP. Ces protéines cibles ont besoin d'un cœur Fe-S pour fonctionner. Par exemple, les aconitases 1, 2 et 3, les DEMETER et DEMETER-like et l'ARN polymérase I et III sous-unité D sont des protéines nécessitant un cœur fer-soufre pour fonctionner (Arnaud et al., 2007; Moeder et al., 2007; Choi et al., 2002; Hirata et al., 2008). Les protéines contenant un cœur Fe-S sont impliquées dans de nombreux processus biologiques essentiels tels que la photosynthèse, la respiration, et les métabolismes du carbone, de l'oxygène, de l'hydrogène, de l'azote et du soufre (Balk and Pilon, 2011).

Il existe trois voies d'assemblage des cœurs de Fe-S chez les plantes : une voie mitochondriale, une voie plastidiale et une voie cytosolique (Figure 23) (Balk and Schaedler, 2014). Ces holoprotéines nouvellement formées vont pouvoir accomplir leur fonction. La biosynthèse des cœurs Fe-S mitochondriale est effectuée par la machinerie ISC avec Isu, IscA et Nfu comme protéines d'échafaudages et la frataxine comme donneur de fer (Bencze et al., 2006; Lill, 2009; Balk and Schaedler, 2014). La biosynthèse chloroplastique se fait par la machinerie SUF et les protéines SufA, SufB et Nfu comme protéines d'échafaudage (Balk and Lobréaux, 2005; Ye et al., 2006; Layer et al., 2007; Balk and Schaedler, 2014). Chez les plantes, la voie cytosolique est composée d'un complexe d'assemblage des cœurs Fe-S appelé CIA (Figure 24). Ce complexe serait composé d'ATR3 et CIAPIN1 (ou AtTAH18 et AtDRE2 respectivement pour l'homologie avec les gènes de levure), de

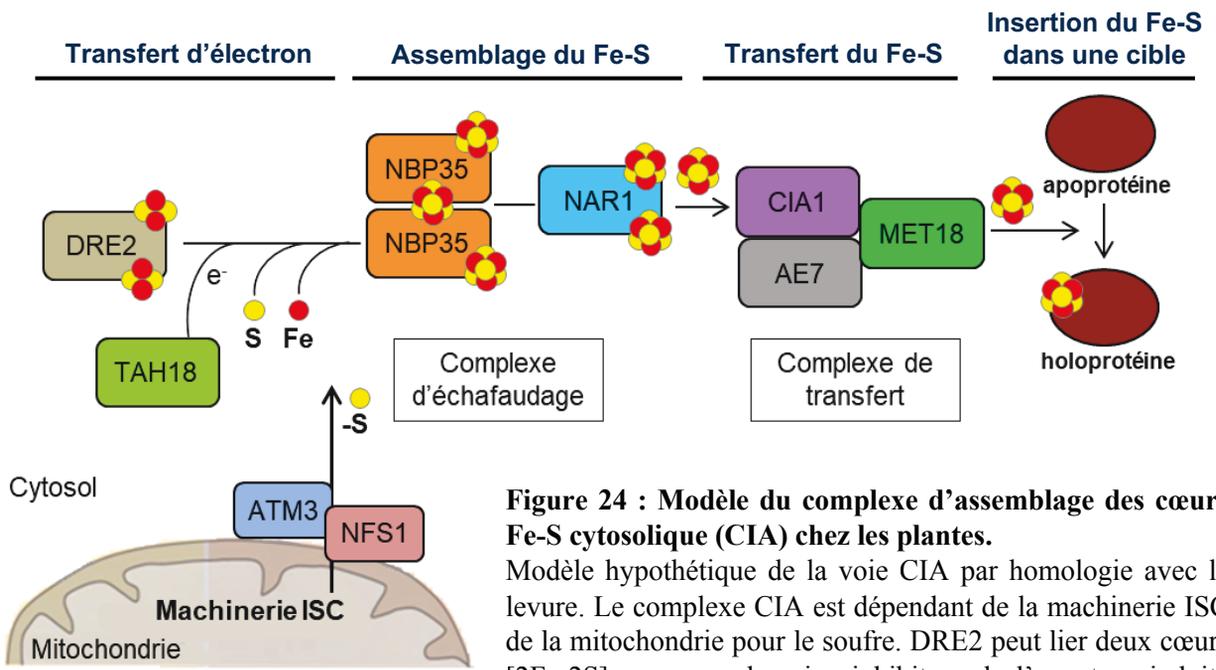


Figure 24 : Modèle du complexe d'assemblage des cœurs Fe-S cytosolique (CIA) chez les plantes.

Modèle hypothétique de la voie CIA par homologie avec la levure. Le complexe CIA est dépendant de la machinerie ISC de la mitochondrie pour le soufre. DRE2 peut lier deux cœurs [2Fe-2S] avec son domaine inhibiteur de l'apoptose induite par cytokine 1 (CIAPIN1). TAH18 interviendrait lors de la phase de transfert d'électrons où un cœur [4Fe-4S] est élaboré à partir d'ajouts de fer et de soufre. Ce cœur serait assemblé par le complexe d'échafaudage faisant intervenir NBP35. Une fois le cœur [4Fe-4S] arrivé à maturité, il serait transféré par NAR1 vers le complexe de transfert impliquant CIA1, AE7 et MET18. Le cœur serait alors livré aux apoprotéines. Inspirée de Paul et al., 2015 et d'Iñigo et al., 2016.

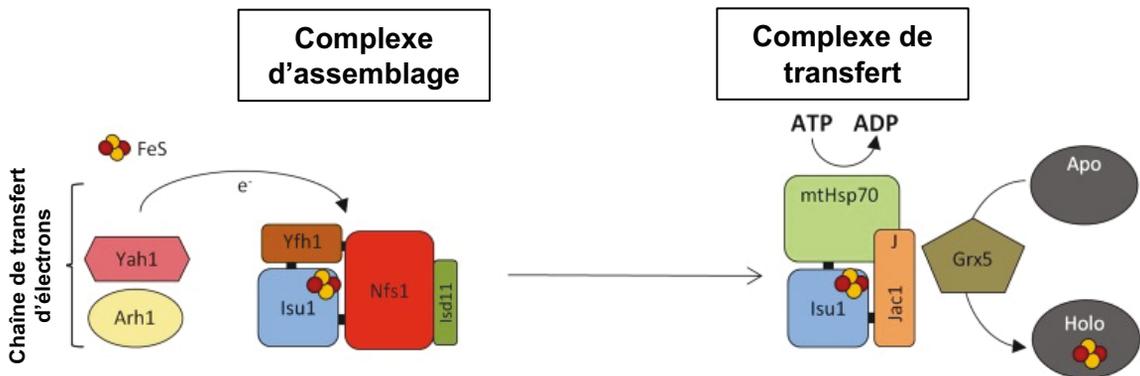


Figure 25 : Implication de la chaperonne moléculaire Hsp70 dans la biogénèse des cœurs Fe-S chez la levure.

Maturation des cœurs Fe-S au sein des mitochondries. Yfh1 lie le complexe préformé Isu1/Nfs1 (Isd11) facilitant la synthèse de cœurs Fe-S. La ferrédoxine de levure Yah1, qui est couplée fonctionnellement à la ferrédoxine réductase Arh1, fournit les électrons nécessaires à la réduction du soufre. Jac1 déplace l'holo-Isu1 du complexe d'assemblage pour former le complexe l'holo-Isu1/Jac1. La mtHsp70 se lie au motif PVK de l'holo-Isu1 en complexe avec Jac1. Le domaine J de Jac1 stimule l'activité ATPase de mtHsp70 facilitant le transfert du cœur Fe-S vers l'apoprotéine receveuse. Grx5 intervient également dans l'insertion du cœur Fe-S dans l'apoprotéine cible. Modifiée de Dutkiewicz and Nowak, 2018.

NBP35, de NAR1, de CIA1, de AE7 et de MET18. Ces membres ont été caractérisés ou déterminés par leur homologie de séquences avec les membres des CIA de levure et d'humain (Varadarajan et al., 2010; Luo et al., 2012; Bernard et al., 2013; Balk and Schaedler, 2014; Bastow et al., 2017). Par exemple, il a récemment été montré que NBP35 interagissait avec DRE2 dans la maturation des coeurs fer-soufre cytosoliques (Bastow et al., 2017). Cette voie CIA est dépendante de la machinerie mitochondriale Fe-S pour le soufre, notamment de NSF1 (pour pallier l'absence de cystéine désulfurase cytosolique) et d'un transporteur ABC fonctionnel des mitochondries, ATM3 (Kispal et al., 1999; Bernard et al., 2009; Lill et al., 2015; Zuo et al., 2017).

V.3.3.2 Le rôle des chaperonnes dans le transfert des coeurs Fe-S : l'exemple de l'HSP70 mitochondriale de levure

Les protéines chaperonnes peuvent être impliquées dans la biogénèse des protéines à cœur Fe-S comme cela a été montré dans la mitochondrie (Dutkiewicz and Nowak, 2018). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine d'échafaudage Isu1 interagit avec la cystéine de la désulfurase Nfs1 (donneur de soufre) et de la frataxine Yfh1 (régulateur de Nfs1 et donneur de fer). Le processus de transfert nécessite l'aide de la protéine chaperonne mitochondriale Hsp70 (Figure 25) (Lill et al., 1999, 2006, 2015). La protéine de type J appelée Jac1 lie la protéine d'échafaudage Isu1 puis elle interagit avec Hsp70 via son domaine N-terminal J ce qui enclenche l'activité ATPase d'Hsp70 et donc le transfert du cœur vers les cibles suivantes (Vickery and Cupp-Vickery, 2007; Craig and Marszalek, 2002). La plupart des organismes comme la levure, les champignons, les plantes et les animaux ont une seule Hsp70 mitochondriale impliquée dans de multiples fonctions telles que le repliement des protéines, l'importation de protéines dans la matrice mitochondriale et comme décrit ici, la biogénèse des protéines à cœur fer-soufre (Schilke et al., 2006). La levure et les champignons expriment une Hsp70 mitochondriale supplémentaire appelée Ssq1 qui est spécialisée dans cette dernière fonction en interagissant uniquement avec Jac1 (Schilke et al., 2006; Pukszta et al., 2010; Delewski et al., 2016).

V.3.3.3 Les GRX à cœur Fe-S :

Chez *Arabidopsis thaliana*, certaines GRX de classes I et II sont capables de lier un cœur Fe-S (Rouhier et al., 2007, 2010; Bandyopadhyay et al., 2008). Le GSH stabilise ces coeurs chez certaines GRX. Par exemple, les GRXC1 du peuplier et d'*Arabidopsis thaliana* et la Grx2 humaine sont sous forme d'homodimères liés par un cœur [2Fe-2S] via la cystéine du site actif de chaque monomère et les cystéines de deux molécules de GSH (Feng et al., 2006; Johansson et al., 2007; Rouhier et al.,

2007; Riondet et al., 2012). Lorsque le GSH est épuisé dans la cellule, ceci affecte la maturation des protéines cytosoliques à cœur Fe-S (Sipos et al., 2002). Le cœur Fe-S est sensible à l'oxydation comme l'exposition à l'oxygène de l'air ou à d'autres molécules oxydantes. Cette perte peut provoquer un changement de fonction comme cela a été montré chez la Grx2 humaine (orthologue des GRX de classe I), qui en contact de GSH oxydé, perd son cœur et restaure son activité de réduction de ponts disulfures (Lillig et al., 2005). Ceci a aussi été montré chez *Arabidopsis thaliana* pour la GRXC1 de classe I (Rouhier et al., 2007; Riondet et al., 2012). Les GRX de classe I pourraient donc constituer des senseurs rédox. Les GRX appartenant à la classe II sont également capables de lier un cœur Fe-S (décrit dans la partie **VII**).

Les GRX sont importantes dans la biosynthèse des cœurs Fe-S et également dans leur transfert vers des protéines cibles. Les GRX présentes dans la mitochondrie participent au transfert du cœur Fe-S des protéines d'échafaudage vers les protéines receveuses (Rodríguez-Manzanaque et al., 2002; Mühlhoff et al., 2003; Bandyopadhyay et al., 2008). Par exemple, la Grx5 (de classe II) de *Saccharomyces cerevisiae* participe au transfert des cœurs Fe-S (Rodríguez-Manzanaque et al., 2002). En effet, les mutants *grx5* qui sont plus sensibles au stress oxydatif et accumulent plus de fer libre, ont des troubles dans la biogénèse mitochondriale des Fe-S et dans la croissance respiratoire (Rodríguez-Manzanaque et al., 1999, 2002). Fait intéressant, d'autres GRX procaryotes ou eucaryotes contenant le site actif CGFS complètent le mutant de levure *grx5* (Cheng et al., 2006; Molina-Navarro et al., 2006). Par exemple, l'expression de l'AtGRXS14 de classe II d'*Arabidopsis thaliana* dans le mutant *grx5* montre que celle-ci est capable de compléter partiellement la fonction de transfert de cœurs Fe-S de Grx5, le transfert se fait vers l'aconitase, protéine impliquée dans la synthèse du citrate en isocitrate (Cheng et al., 2006). Elle protège également la levure du stress oxydatif et inhibe l'accumulation de fer. Récemment, il a été montré que l'AtGRXS15 de classe II était impliquée dans l'assemblage des cœurs Fe-S dans la mitochondrie notamment dans le transfert vers des protéines cibles (Moseler et al., 2015; Ströher et al., 2016). Enfin, des essais de protéomique montrent qu'AtGRXS17 est associée avec la majorité des membres du complexe cytosolique d'assemblage des cœurs Fe-S (Iñigo et al., 2016).

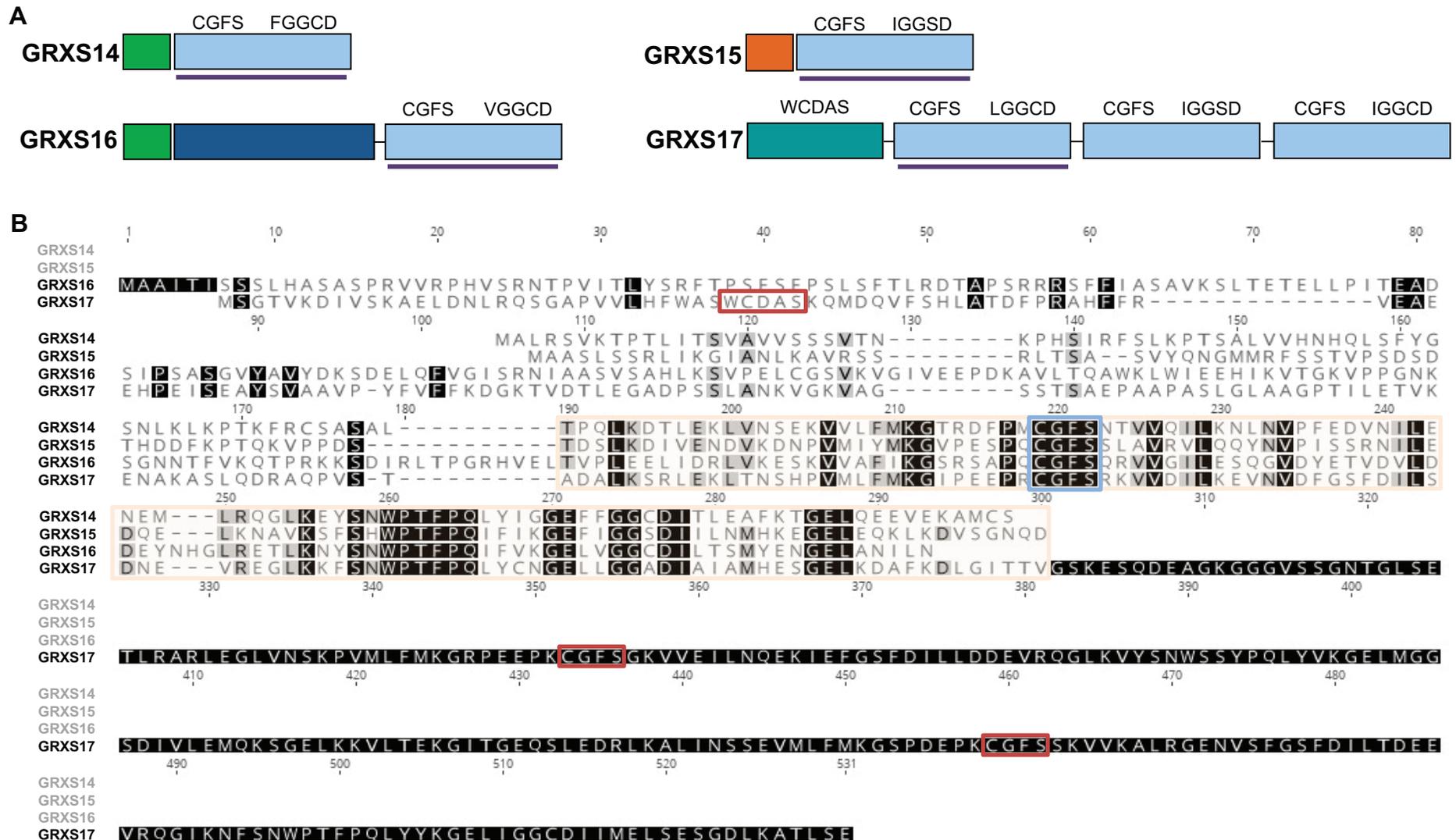


Figure 26 : Alignement des séquences des quatre GRX de la classe II.

(A) Représentation schématique des protéines GRXS14, GRXS15, GRXS16 et GRXS17 de la classe II. Le trait violet sous les domaines GRX indique les domaines qui sont conservés. (B) Les séquences protéiques des quatre GRX de la classe II ont été alignées par le logiciel Geneious et le programme d'alignement de séquence multiple ClustalW alignment. Les domaines GRX sont conservés (encadré orange) entre les quatre protéines. Le site actif CGFS est en bleu et les autres sites actifs de GRXS17 en rouge.

VI. Les GRX de classe II d'*Arabidopsis thaliana* :

Chez *Arabidopsis thaliana*, la classe II est composée de quatre GRX à cœur Fe-S : deux protéines chloroplastiques AtGRXS14 et AtGRXS16, une mitochondriale AtGRXS15 et une cytosolique et nucléaire AtGRXS17 (Figure 26) (Rouhier et al., 2008; Bandyopadhyay et al., 2008).

VI.1 Les glutarédoxines GRXS14 et GRXS16 :

Les deux protéines chloroplastiques, GRXS14 (AT3G54900) et GRXS16 (AT2G38270), présentent différentes fonctions en relation avec leur cœur Fe-S et leur réponse à des stress abiotiques. Une étude démontre que ces deux protéines ont le potentiel de fonctionner en tant que protéines d'échafaudage pour l'assemblage des cœurs [2Fe-2S] pour ensuite les transférer à des protéines receveuses (Bandyopadhyay et al., 2008). Les GRXS14 et GRXS16 restaurent également le phénotype du mutant de levure *grx5* (Bandyopadhyay et al., 2008; Liu et al., 2013a).

VI.1.1 La glutarédoxine GRXS14 :

La GRXS14, également appelée AtGRXcp ou CXIP1 est une protéine plastidiale contenant un seul domaine de type GRX (Figure 26). Peu détectable dans les graines, la protéine GRXS14 se trouve en plus grande abondance dans les organes photosynthétiques, particulièrement dans les jeunes feuilles par rapport aux racines, aux boutons floraux et aux fleurs (Rey et al., 2017). Le niveau d'expression de *GRXS14* est régulé lors de différents stress abiotiques. Il diminue en conditions de forte lumière en jours longs et en hautes températures et augmente fortement lors de faibles températures, de stress salin et sécheresse (Rey et al., 2017). Comme vu précédemment, lorsqu'elle est exprimée dans la mitochondrie, GRXS14 complémente partiellement la fonction de la Grx5 de levure dans la synthèse et l'assemblage des cœurs Fe-S. Elle permet au mutant *grx5* d'accumuler moins de fer et de mieux résister au stress oxydatif (Rodríguez-Manzaneque et al., 1999, 2002; Cheng et al., 2006; Bandyopadhyay et al., 2008). La Grx5 de la fougère *Pteris vittata* (PvGrx5) présente une forte homologie de séquence peptidique avec GRXS14. Elle participe, quant à elle, à la tolérance à l'arsenic en régulant le niveau d'arsénite intracellulaire directement et indirectement par modulation de l'aquaglycéporine (Sundaram et al., 2008). Sa surexpression dans des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* augmente la tolérance des plantes à l'arsenic et diminue l'accumulation de cet élément dans les feuilles (Sundaram et al., 2009). Elle permet d'augmenter la tolérance des plantes

à de fortes températures et réduit les dommages oxydatifs sur les protéines (Sundaram and Rathinasabapathi, 2010).

VI.1.2 La glutarédoxine GRXS16 :

GRXS16, également appelée AtGRX2 ou CXIP2, est composée de 2 domaines, un domaine N-terminal qui possède une activité endonucléase nommé NTD et un domaine GRX en C-terminal (Figure 26) (Liu et al., 2013a). Cette étude suggère un lien entre le métabolisme de l'ADN plastidial et la régulation redox. En effet, GRXS16 est capable de digérer de l'ADN génomique, elle peut donc fonctionner comme une endonucléase dans les chloroplastes. La protéine GRXS16 est exprimée dans la plupart des organes. Elle est peu détectée dans les extraits de racines mais elle est assez abondante dans les boutons floraux et les fleurs pratiquement au même niveau que la tige et les feuilles (Rey et al., 2017). Le niveau d'expression de cette protéine ne change pas en condition de stress abiotiques (sécheresse, salin, température et photo-oxydatif) sauf lors de fortes lumières dans deux conditions, en jours longs et en fortes températures. Des études ont été menées sur l'homologue de *GRXS16* chez la tomate (*Solanum lycopersicum*), il s'agit de *SIGRX1* (Guo et al., 2010). Ce gène est induit en réponse au stress oxydatif, à la sécheresse et au sel. Sa mise sous silence chez *Solanum lycopersicum* ou sa surexpression chez *Arabidopsis thaliana* suggèrent que SIGRX1 joue un rôle important dans la tolérance à ces trois stress abiotiques. De plus, la surexpression de la GRXS16 de tomate augmente la teneur des plantes en glutathion (Hou et al., 2018).

VI.2 La glutarédoxine GRXS15 :

La GRXS15 est une protéine mitochondriale contenant un seul domaine de type GRX (Figure 26). Elle est impliquée dans l'assemblage des cœurs Fe-S notamment dans leur maturation et leur transfert (Moseler et al., 2015). GRXS15 complémente partiellement le mutant *grx5* de levure et est essentielle à la maturation des protéines à cœur Fe-S. Le mutant KO *grxs15* est embryon-létal (Moseler et al., 2015). Le mutant GRXS15^{KD} (knock-down) présente un défaut dans la maturation de la lipoate synthase mitochondriale, une protéine à cœur Fe-S (Ströher et al., 2016). Il est également impacté dans la croissance de la plante notamment la croissance racinaire. La longueur moyenne des racines primaires de GRXS15 est intermédiaire à celle du contrôle Col-0 et à un autre mutant de la même classe, le mutant KO *GRXS17* (se référer au I. du chapitre 1), ce qui en fait également un acteur de la croissance racinaire. Enfin, une récente étude a montré que GRXS15 pouvait oxyder la roGFP avec l'aide de GSSG mais n'était pas capable de la réduire malgré la présence de GSH (Begas et al., 2017).

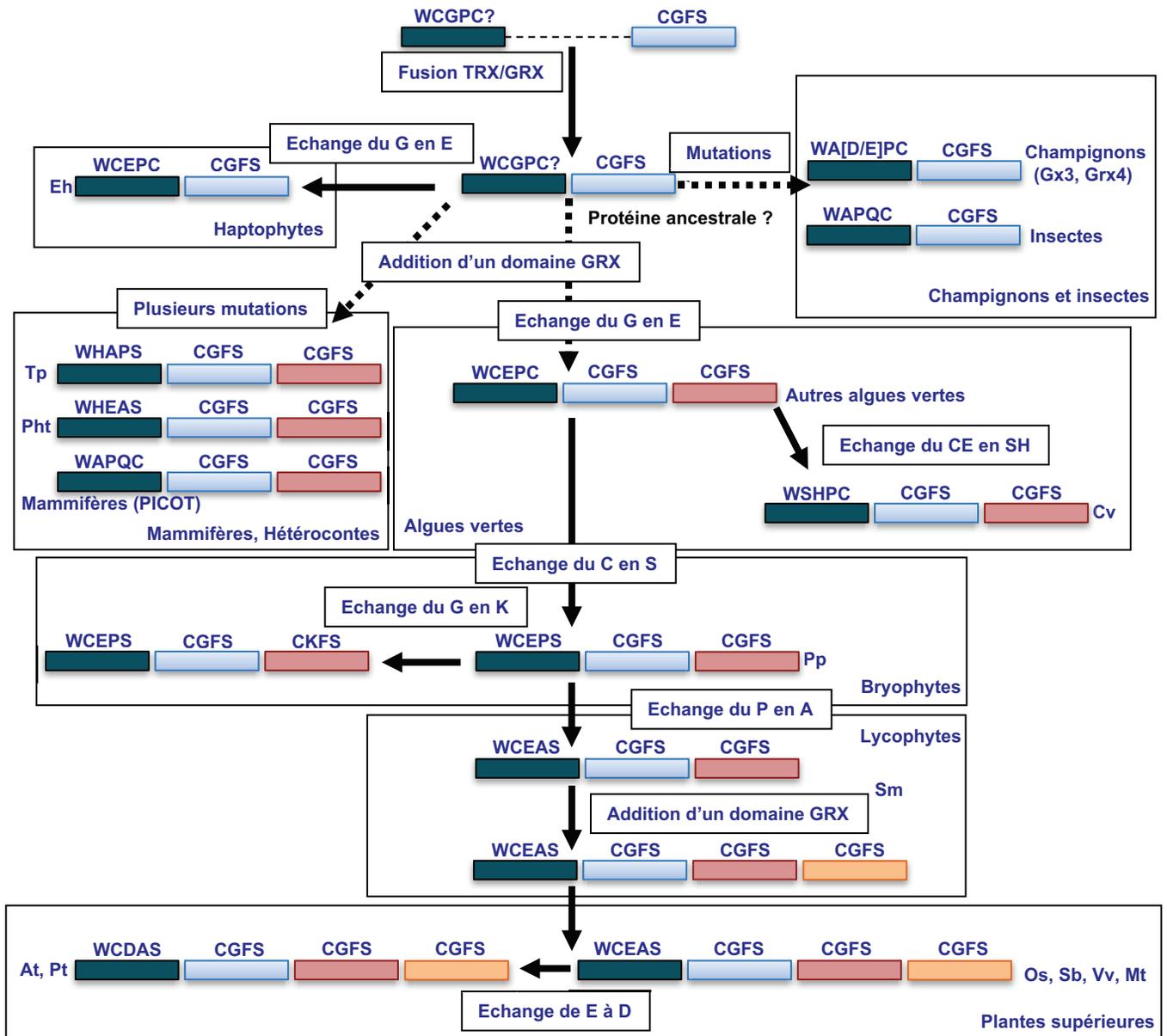


Figure 27 : Représentation schématique de l'évolution hypothétique reconstituée des orthologues de GRXS17.

Les domaines TRX et GRX sont représentés par des rectangles avec le site actif indiqué en haut. Les grandes étapes présumées pour la formation de l'isoforme GRXS17 de plantes supérieures d'après trois événements : (1) fusion d'un gène TRX et d'un gène GRX ; (2) ajout d'un domaine GRX appartenant à un ancêtre commun d'hétéroconte et d'algues vertes ; et (3) l'ajout d'un deuxième domaine GRX dans les lycophytes. L'ajout d'un domaine GRX dans la partie C-terminale de la protéine serait peut-être due à une duplication partielle. La possibilité d'une évolution du site actif du domaine thiorédoxine est indiquée par les mutations ponctuelles. Modifiée Couturier et al., 2009.

VII. La glutarédoxine GRXS17 :

VII.1 Généralités :

La protéine AtGRXS17 est une glutarédoxine de 53kDa à cœur fer-soufre faisant partie de la classe II. Cette protéine fait partie des PKC-Interacting Cousin Of TRX (PICOT) qui sont des protéines présentes dans une grande partie des organismes et ayant souvent la caractéristique de posséder un domaine TRX et au moins un domaine GRX (Isakov et al., 2000). GRXS17 a la particularité d'être composée de quatre domaines, un domaine de type thiorédoxine avec WCDAS comme site actif potentiel, suivi de 3 domaines GRX avec CGFS comme site actif. GRXS17 est très conservée chez les plantes supérieures mais également dans les autres règnes (Figure 27) (Couturier et al., 2009). Le schéma évolutif proposé par les auteurs suggère une fusion entre un domaine de type thiorédoxine avec WCGPC comme site actif et un domaine de type glutarédoxine avec CGFS comme site actif. Les orthologues chez les champignons et les insectes contiennent une version de ces deux domaines avec respectivement WA[D/E]PC et WAPQC comme sites actifs sur leur premier domaine. Chez les mammifères, l'orthologue aurait acquis un domaine GRX supplémentaire au cours de l'évolution. La présence des quatre domaines est spécifique à certains Lycophytes et aux plantes supérieures.

VII.2 La GRX3 de mammifères et les Grx3/Grx4 de levure : des orthologues de GRXS17

Comme décrit plus haut, GRXS17 possède des orthologues dans les autres règnes dont le couple Grx3/Grx4 de levure et la Grx3 de mammifères.

VII.2.1 Les Glutarédoxines 3 et 4 de levure :

L'orthologue de GRXS17 chez la levure est le couple Grx3/Grx4 qui sont deux GRX monothiols redondantes composées d'un domaine TRX en N-terminal et d'un domaine GRX monothiol en C-terminal (Herrero and De La Torre-Ruiz, 2007; Lillig et al., 2008). Elles sont localisées dans le cytoplasme et le noyau et forment un cœur Fe-S lié à leur domaine GRX (Herrero and De La Torre-Ruiz, 2007). La suppression de Grx3/4 dans la levure entraîne des défauts dans l'assemblage des cœurs Fe-S cytosoliques et mitochondriaux et des anomalies dans les protéines contenant des [2Fe-2S] (Mühlenhoff et al., 2010). Grx3 et Grx4 se lient à Fra1 et Fra2. Le complexe Grx3/Grx4-Fra1/2 agit comme intermédiaire entre la mitochondrie et le noyau pour pallier la baisse de la biogénèse des

cœurs Fe-S dans la mitochondrie (Kumánovics et al., 2008). Le couple Grx3/4 a également un rôle dans l'homéostasie du fer en régulant la fonction d'Aft1, un facteur de transcription contrôlant la régulation du fer. (Ojeda et al., 2006; Pujol-Carrion et al., 2006). Enfin, Grx3 et Grx4 sont impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine grâce à leur domaine thioredoxine et l'interaction avec Slt2 qui est une MAPK (Pujol-Carrion and De La Torre-Ruiz, 2010)). L'absence simultanée de ces trois protéines donne un phénotype létal. De plus, Slt2 et les deux Grx3 et Grx4 interagissent *in vivo*, interaction nécessaire pour activer la réponse oxydative (Pujol-Carrion and Torre-Ruiz, 2017). Pour finir, une preuve pouvant indiquer qu'il existe une fonction conservée entre les orthologues de GRXS17 est l'expression d'AtGRXS17 dans *grx3/grx4* qui complémente la croissance du double mutant ainsi que la résistance face à des stress thermiques et oxydatifs (Wu et al., 2012).

VII.2.2 La Glutarédoxine 3 de mammifères :

Il existe un orthologue de la GRXS17 chez les mammifères, il s'agit de la GRX3 qui était anciennement appelée Thiorédoxine-like 2 (TXNL2) ou PICOT. Elle possède également un cœur Fe-S et est localisée dans le cytoplasme et le noyau (Haunhorst et al., 2010). Plusieurs études ont été menées sur cette protéine qui présente plusieurs fonctions toutes liées au stress oxydatif. Elle joue un rôle important dans le développement, la fonction cardiaque et la réponse immunitaire (Li et al., 2012). GRX3 est essentielle pour le développement embryonnaire ; les embryons de souris dépourvus de GRX3 meurent entre le stade E12.5 et E14.5 (Cha et al., 2008). Chez la souris, GRX3 est induit par divers oxydants et a une fonction conservée dans la protection des cellules contre le stress oxydatif (Cheng et al., 2011b). GRX3 joue un rôle antagoniste dans les cellules cancéreuses. En effet, elle est surexprimée dans les cellules cancéreuses de carcinomes du colon et du poumon humain, ce qui stimule leur croissance (Cha and Kim, 2009; Qu et al., 2011). Ces données suggèrent que GRX3 pourrait être une cible pour le traitement du cancer. Comme chez Grx3/Grx4 de levure, la Grx3 humaine peut former un complexe impliquant des cœurs Fe-S de ses domaines GRX (Haunhorst et al., 2010). GRX3 interagit avec deux BOLA2 humaines sur ses deux domaines GRX formant ainsi un complexe lié par l'intermédiaire des cœurs Fe-S (Li et al., 2012). Ce complexe ainsi formé va transmettre ses cœurs à l'apo-anamorsine donnant l'holo-anamorsine mature (Banci et al., 2015). La BOLA2 humaine est un orthologue de la Fra2 de levure (protéine agissant avec Grx3/4) (Li and Outten, 2012). Nous pourrions donc imaginer un mécanisme conservé dans le transfert des cœurs Fe-S chez la Grx3 humaine et le couple Grx3/4 de levure. Enfin, les cellules mutantes *grx3* sont déficientes en fer et présentent une carence dans la maturation de l'hémoglobine, suggérant également un rôle commun dans l'homéostasie du fer (Haunhorst et al., 2013).

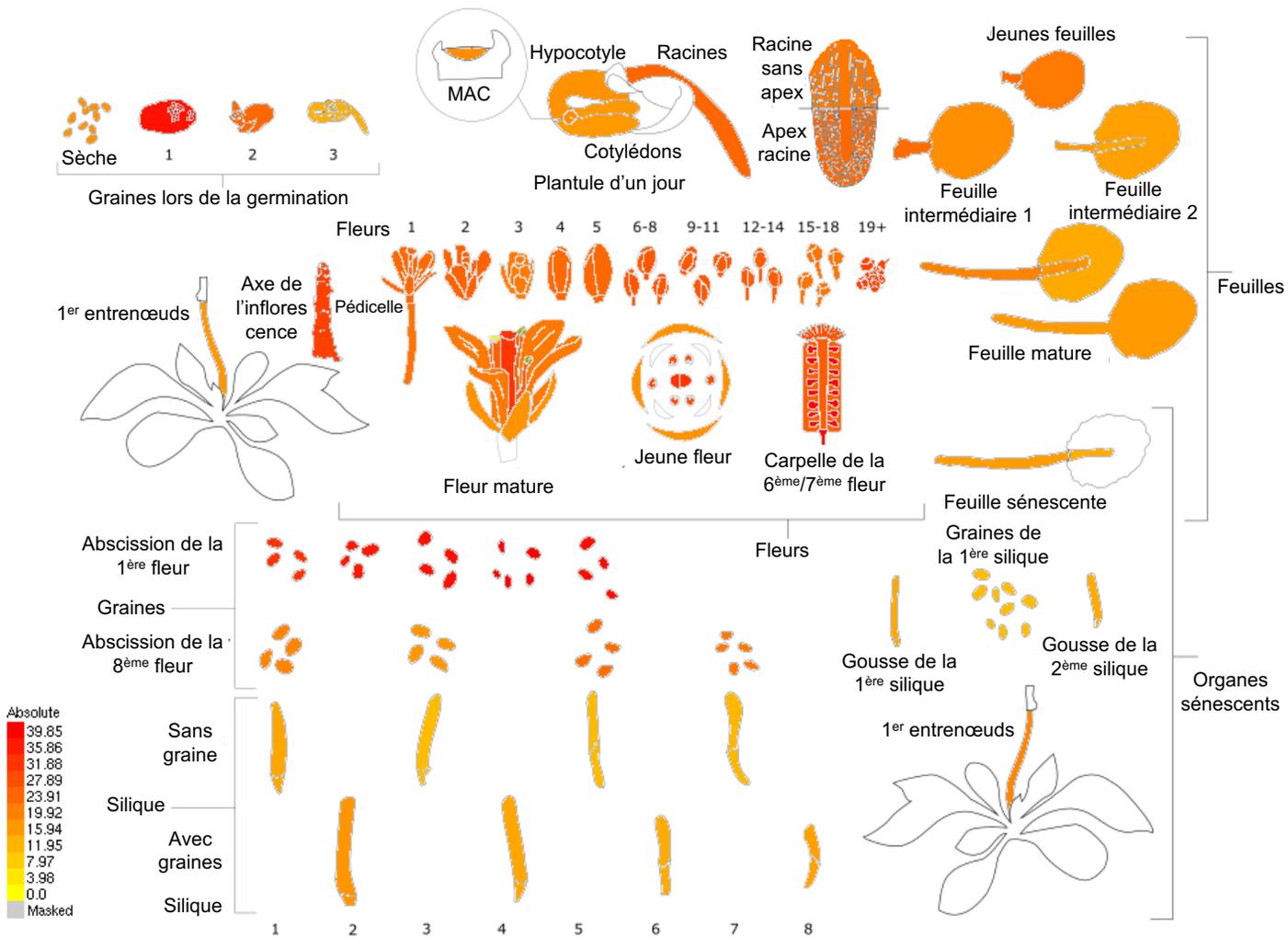


Figure 28 : Expression tissulaire de GRXS17 (AT4G04950) à partir de efp browser klepikova.

Les données proviennent d'une carte haute résolution du transcriptome développemental d'*Arabidopsis thaliana* basée sur un RNA-seq (Klepikova et al., 2016). (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Klepikova_Atlas&modeInput=Absolute&primaryGene=At4g04950&secondaryGene=At3g27340&override=&threshold=308.93&modeMask_low=None&modeMask_stddev=None&gene_alias1=AtGRXS17&gene_alias2=).

VII.3 L'expression et la localisation de GRXS17 :

Dans des conditions normales de croissance dans l'écotype Columbia-0, le niveau d'expression de *GRXS17* varie d'un tissu à l'autre (Figure 28) (Cheng et al., 2011a; Knuesting et al., 2015; Klepikova et al., 2016). Il est plus important dans les racines et les fleurs par rapport aux feuilles matures et à la tige. Une étude complémentaire d'hybridation *in situ* montre une forte présence de *GRXS17* dans toutes les cellules méristématiques, les cellules de la tige, dans le pollen et les ovules (Knuesting et al., 2015). L'utilisation de plantes transgéniques GRXS17-GUS a permis de confirmer son expression dans les jeunes cotylédons, les feuilles en croissance, les racines, les anthères et dans le développement des embryons (Cheng et al., 2011a). Une étude plus récente confirme et complète ces données d'expression au niveau protéique, GRXS17 étant exprimée de façon plus abondante dans les tiges, les jeunes feuilles et les fleurs (Knuesting et al., 2015). Les données disponibles sur efp browser (<http://bar.utoronto.ca/>) confirment ces localisations tissulaires (Figure 28). Elles montrent que GRXS17 est également très exprimée dans les graines lors des étapes précoces de la germination et dans le carpelle de la fleur. GRXS17 est donc exprimée dans différents types cellulaires que ce soit au niveau des méristèmes, des tissus vasculaires et des organes reproducteurs. Différentes approches expérimentales (fractionnements cellulaires, expression de protéines de fusion GRXS17:GFP) montrent que GRXS17 est localisée dans le cytoplasme et dans le noyau (Knuesting et al., 2015).

VII.4 GRXS17, une protéine à cœur Fe-S :

GRXS17 est une protéine à cœur Fe-S de type [2Fe-2S]. La protéine recombinante GRXS17 est capable d'incorporer trois cœurs, un dans chaque domaine GRX (Knuesting et al., 2015). Cette incorporation est dépendante des cystéines du site actif et du GSH. GRXS17 complète également le mutant de levure *grx5* (Knuesting et al., 2015). La protéine GRXS17 se trouve *in vivo* sous forme d'un homodimère lié par des liaisons faibles (Knuesting et al., 2015). Nous pouvons donc imaginer que ce dimère coordonne les cœurs Fe-S par des liaisons faibles *via* les cystéines des sites actifs. Au vu des données chez ses orthologues, une fonction moléculaire de GRXS17 en relation avec ses cœurs Fe-S et le complexe CIA a été longtemps suggérée. Récemment, il a été montré par des approches protéomiques que GRXS17 était associée avec la plupart des protéines du CIA (Iñigo et al., 2016). Il s'agit de MET18, DRE2/CIAPIN, NAR1, CIA1 et AE7/CIA2. L'interaction avec DRE2 a été validée en système hétérologue et *in planta*, ce qui a amené les auteurs à proposer un modèle où GRXS17 associée à DRE2 transfère ses cœurs à une apoenzyme d'une part et à DRE2 d'autre part. DRE2 donnerait ses cœurs [2Fe-2S] à NBP35, incorporés en [4Fe-4S], et elle-même aux autres membres du

complexe afin de permettre le transfert vers une autre apoenzyme. Cependant, il semblerait que GRXS17 ait un effet mineur sur ce métabolisme des cœurs Fe-S puisque les activités des enzymes du CIA ne sont pas considérablement altérées dans le mutant KO GRXS17 (Knesting et al., 2015). Des essais en système hétérologue mettent en évidence l'interaction de GRXS17 avec une autre protéine contenant un cœur Fe-S, il s'agit de BolA2 (At5G09830) (Couturier et al., 2014). Fait intéressant, le second domaine de GRXS17 seul est suffisant dans cette interaction. BolA2 est également localisée dans le cytosol et le noyau ce qui renforce l'idée d'une fonction commune comme ceci a été montré chez la GRX3 humaine (Banci et al., 2015). BolA2 est une protéine très exprimée dans les racines comme GRXS17 et elle est un interactant de celle-ci dans le cytosol (Cheng et al., 2011a; Qin et al., 2015). Les mutants *bola2* présentent une croissance normale, ils sont plus résistants à l'excès de fer et au stress oxydatif induit par le méthyl viologène (Qin et al., 2015). BolA2 pourrait jouer le rôle de répresseur de GRXS17 en réponse à des stress abiotiques tels que les stress oxydatifs ou l'excès de fer (Cheng et al., 2011a; Qin et al., 2015; Wu et al., 2012).

VII.5 Rôle de GRXS17 dans la croissance de la plante :

Les premières études portant sur la caractérisation du mutant KO d'ADN-T *grxs17* dans Col-0 ont montré l'importance de cette protéine dans la croissance de la plante (Cheng et al., 2011a). Des plantes *grxs17* ayant poussé dans des conditions normales de culture à 22°C en jours longs (JL - 16h/8h) présentent des racines primaires plus courtes que l'écotype contrôle Col-0. En parallèle, le mutant présente également moins de feuilles que le sauvage, ce qui suggère que GRXS17 joue un rôle important dans la croissance post-embryonnaire de la plante. Dans ces deux cas, le mutant présente clairement un retard de croissance, c'est également le cas lors de la floraison qui est également retardée (Cheng et al., 2011a; Knesting et al., 2015). GRXS17 est aussi requis pour la division cellulaire lors de jours longs (Knesting et al., 2015). En effet, *grxs17* possède un méristème apical avec une aire méristématique qui est plus petite que le sauvage en condition de jours longs, ce qui peut expliquer le défaut de croissance au niveau des feuilles (Knesting et al., 2015). Dans les couches cellulaires L1, L2 et L3, le nombre de cellule est diminué mais leur taille est plus grande ce qui révèle une déficience dans la division des cellules souches compensée par une expansion cellulaire plus importante. De manière générale, les défauts de croissance observés chez le mutant sont moins sévères en jours courts (JC - 8h/16h), le méristème apical de *grxs17* n'est pas altéré, ce qui suggère un lien entre GRXS17 et la photopériode (Knesting et al., 2015). Enfin, GRXS17 interagit avec le facteur nucléaire NF-YC11/NC2 α qui est important dans la durée de la photopériode. Les auteurs suggèrent que le rôle de GRXS17 dans la maintenance des méristèmes est rempli par le relais d'un

signal redox-dépendant de NF-YC11/NC2 α (Knesting et al., 2015).

VII.6 Rôle de GRXS17 dans la réponse aux stress environnementaux :

L'importance de GRXS17 dans la croissance racinaire et foliaire a également été démontrée à des températures plus élevées (Cheng et al., 2011a; Knesting et al., 2015). En effet, *grxs17* possède un gros défaut de croissance des racines et des feuilles lorsque les plantes sont cultivées à 28°C. Au niveau de l'expression des ARN, *GRXS17* est induit en réponse à une augmentation de la température à 28°C au bout de 24h (Cheng et al., 2011a). Le mutant présente un défaut de transport basipète de l'auxine à 22°C mais également à 28°C et il est insensible à une application exogène d'auxine. La pointe racinaire est malformée et une forte diminution de la prolifération cellulaire a été observée, ce qui suggère qu'une différenciation s'opère à la place d'une division cellulaire (Cheng et al., 2011a). En parallèle, une accumulation plus importante d'H₂O₂ dans les racines et dans les faisceaux vasculaires a été détectée à 28°C dans le *grxs17* par rapport à Col-0 mais la signification de cette accumulation est mal comprise (Cheng et al., 2011a). La réintroduction de la protéine GRXS17 dans le fond mutant confirme l'important rôle de GRXS17 dans la croissance à 28°C notamment dans la maintenance du méristème apical (Knesting et al., 2015). En parallèle, des analyses biochimiques montrent une fuite d'ions plus importante et une accumulation supérieure d'anthocyanes, signes que la plante mutante est stressée et que la membrane lipidique est endommagée. Ces défauts sévères de croissance qui sont observés au niveau des racines, des feuilles et de la production de boutons floraux sont cependant stoppés lorsque la température de croissance est abaissée à 22°C (Cheng et al., 2011a). GRXS17 joue un rôle important dans la coordination florale en réponse aux variations environnementales telles que la température et la longueur du jour (Cheng et al., 2011a; Knesting et al., 2015). En effet, lorsque *GRXS17* pousse en condition de jours longs et de fortes lumières, il y a un délai et un défaut dans la floraison, ils forment des hampes secondaires seulement après quelques temps. En condition de jours courts, le développement floral est accéléré et la croissance de l'appareil végétatif n'est pas affectée. Au niveau de la croissance foliaire, l'ajout de forte lumière en JL l'aggrave, à noter que c'est peut-être la température qui est responsable puisqu'elle est de 24°C au lieu de 22°C dans cette dernière condition. Lors de la floraison à 28°C, le mutant présente un phénotype PIN, la hampe primaire ne faisant pas de boutons floraux (Gälweiler et al., 1998; Cheng et al., 2011a). Enfin, lorsque le mutant pousse à 15°C, il ne présente plus de défaut de croissance et de floraison, son développement est proche du Col-0 (Knesting et al., 2015). L'aggravation de la croissance chez le mutant est donc dépendante de la longueur du jour et de l'augmentation de la

température.

VII.7 Les autres rôles connus de GRXS17 :

Les GRX monothioles ont une fonction anti-oxydante qui protège les cellules des stress oxydatifs (Cheng, 2008; Cheng et al., 2006; Herrero and De La Torre-Ruiz, 2007). Cette fonction n'a pas été clairement démontrée pour GRXS17. Cependant, GRXS17 avec son système de réduction NADPH/GR/GSH est capable de réduire la protéine BOLA2 oxydée *in vitro* (Couturier et al., 2014). Une autre homologie de fonction que partage GRXS17 avec ses orthologues de levure est un rôle dans l'homéostasie du fer notamment dans la protection des plantes contre une carence en fer et les dommages oxydatifs induits (Yu et al., 2017). Ces auteurs montrent que GRXS17 est capable de supprimer le phénotype d'accumulation de fer dans le double mutant de levure *grx3grx4*, ce qui suggère que GRXS17 pourrait jouer un rôle conservé dans la régulation du fer chez les plantes. Le mutant *grxs17* est sensible au stress oxydatif et la production de ROS augmente dans celui-ci lors d'une carence en fer ce qui suggère que GRXS17 jouerait un rôle dans le contrôle du stress oxydatif induit lors de cette carence (Yu et al., 2017). GRXS17 serait également associée aux enzymes du métabolisme de la purine pouvant contribuer à la voie de récupération de ces dernières (Iñigo et al., 2016). Ces mêmes auteurs ont aussi montré que GRXS17 interagissait avec la sous-unité CTU mais qu'elle n'était pas essentielle dans la fonction de celle-ci dans la thiolation de l'anticodon de l'ARNt. Une autre étude a quant à elle, montré que GRXS17 était une cible des E3 ubiquitines ligases RGLG3 et RGLG4 (Nagels Durand et al., 2016). Ces protéines vont former un complexe hétérodimère et interagir directement avec GRXS17 dans le cytoplasme et le noyau. UBC30, une protéine proche de la HsUbcH5b humaine importante dans la polyubiquitination, pourrait également être impliquée dans cette voie où GRXS17 est polyubiquitinée afin d'être envoyée au protéasome 26S pour sa dégradation (Nagels Durand et al., 2016). La GRX3 humaine présente aussi un site d'ubiquitination (Wagner et al., 2011). Chez *Arabidopsis thaliana*, cette voie serait inhibée par GLB3 (Nagels Durand et al., 2016).

Des études sur GRXS17 ont été menées sur des espèces cultivées comme la tomate et le riz. La surexpression d'*AtGRXS17* dans les plants de tomates (*Solanum lycopersicum*) pourrait augmenter l'activité de la catalase et l'expression des HSP et des HSF tel que LeMTHSP, LeERHSP21.5 et LeHSP21 puis LeHSFA1a et LeHSFA2 (Wu et al., 2012). L'activité de la catalase va réduire

l'accumulation d' H_2O_2 et ainsi les dommages oxydatifs sous stress thermique et stress oxydatif. Enfin, les auteurs montrent une relocalisation d'AtGRXS17-GFP dans le noyau lors d'un stress thermique, ce qui suggère une fonction de thermotolérance associée à sa présence dans le noyau. La surexpression d'*AtGRXS17* renforce la tolérance des tomates face à un stress froid à 4°C pendant 3 semaines (Hu et al., 2015). Cette lignée accumule plus de sucres que le contrôle et AtGRXS17 est relocalisée dans le noyau comme lors d'un stress thermique (Hu et al., 2015; Wu et al., 2012). La lignée présente des activités augmentées d'enzymes anti-oxydantes, telles que SOD, CAT et POD, en condition normale et lors d'un stress froid. Elle réduit également l'accumulation d' H_2O_2 et confère une meilleure tolérance au stress oxydatif chez la tomate (Hu et al., 2015). Enfin, la surexpression d'*AtGRXS17* confère la tolérance au stress sécheresse (Wu et al., 2017). Cette tolérance pourrait s'expliquer par un niveau d'expression plus élevé de SIAREB1, un régulateur transcriptionnel de la voie de signalisation de l'ABA, lors du stress. Une étude a également été menée sur l'homologue fonctionnel *OsGRXS17* chez le riz *Oriza sativa* (Hu et al., 2017). La mise sous silence d'*OsGRXS17* confère au riz une tolérance à la sécheresse car ces plantes accumulent plus d'eau grâce à une plus importante fermeture des stomates. Dans ses stomates, l' H_2O_2 s'accumule plus que chez le contrôle, ce qui pourrait être lié à l'importante fermeture des stomates dans cette lignée.

VIII. L'objectif de la thèse :

Le projet de thèse en 2015 visait à caractériser la (ou les) fonction(s) de la protéine GRXS17 dans la croissance racinaire à des températures normales et plus élevées. Des résultats préliminaires en collaboration avec Yee-Yung Charng (Taïwan) ont suggéré un rôle de GRXS17 dans la thermotolérance. Cet aspect là a également été développé. Ce projet était la continuité des travaux sur GRXS17 menées dans l'équipe (avec quelques collaborations) par Christophe Riondet mon codirecteur (Knuesting et al., 2015). L'étude de cette protéine présentait un grand intérêt pour plusieurs raisons qui ont déjà été décrites dans la partie VII. Pour commencer, le mutant *grxs17* présente des défauts de croissance à 20°C et 28°C. De plus, la protéine GRXS17 est assez spécifique par rapport aux autres GRX puisqu'elle possède quatre domaines dont un domaine de type thiorédoxine. Elle est également capable de lier des cœurs Fe-S.

L'objectif de cette thèse était donc de comprendre le rôle de GRXS17 dans la croissance de la plante à 20°C et à 28°C et dans la thermotolérance. Pour cela, trois axes ont été élaborés. Le mutant *grxs17* a été caractérisé à plusieurs niveaux et dans différentes conditions de croissance (chapitre 1). Le lien entre la structure et la fonction de la protéine GRXS17 a ensuite été étudié afin de comprendre le rôle de sa localisation, des cystéines des sites actifs et des différents domaines. Ensuite, des études *in vitro* sur la protéine recombinante ont été menées (chapitre 2). Le but était d'explorer le rôle enzymatique de la protéine GRXS17. Enfin, des analyses plus globales de séquençage de l'ARN et de métabolomique ont été mises en place afin de compléter nos analyses sur la (ou les) fonction(s) de GRXS17 à 20°C et à 28°C (chapitre 3).

Avant propos liés aux chapitres :

Les trois chapitres sont composés tout d'abord d'une partie **résultats** qui regroupe une légère introduction expliquant nos stratégies et les résultats à proprement parler. Ensuite, d'une partie **discussion** qui reprend l'ensemble des conclusions du chapitre et propose quelques perspectives. Les trois chapitres étant fortement liés une **discussion générale** est proposée à la fin.

CHAPITRE 1

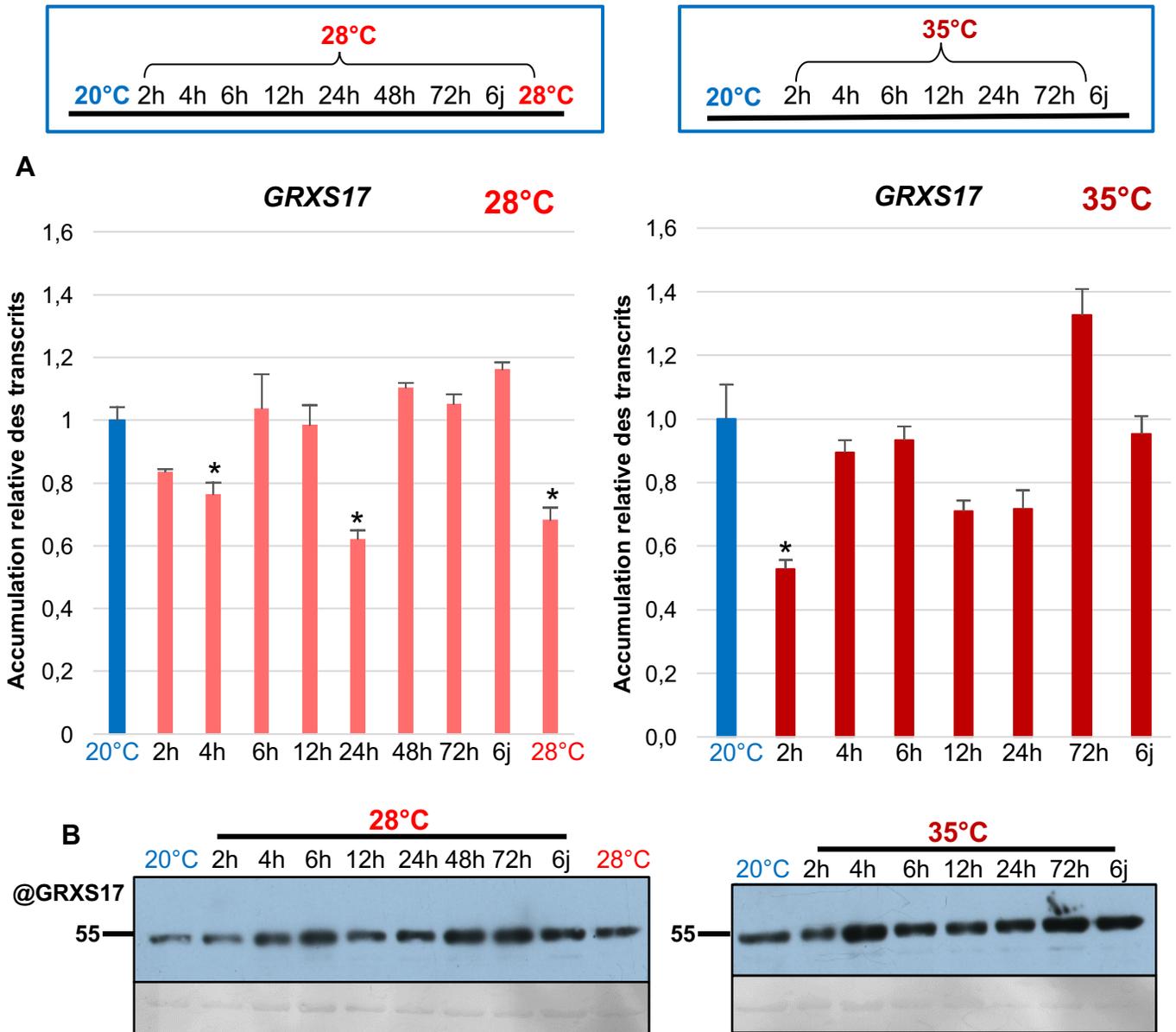


Figure 29 : Analyses des niveaux d'ARN et de protéines de GRXS17 à 20°C, à 28°C et en réponse à l'augmentation de la température (28°C et 35°C).

Les plantules de Col-0 ont poussé 14 jours dans des conditions classiques de culture à 20°C (ou 28°C) et ont subi différents stress thermiques à 28°C et à 35°C au cours du temps. **A.** Accumulations relatives des transcrits de *GRXS17* obtenus par RT-PCR quantitative à partir d'extraits totaux d'ARN de plantules entières de Col-0. Graphiques représentatifs de deux répliques biologiques contenant chacun 3 répliques techniques. Les valeurs sont normalisées sur la condition 20°C qui a été ramenée à 1. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; une p-value inférieure à 0,05 est représentée par * pour la comparaison avec 20°C. **B.** Niveaux relatifs de protéines obtenus par Western Blot à partir d'extraits totaux de protéines de plantules entières de Col-0. Pour chaque condition, 10µg de protéines ont migré et ont été détectées avec l'anticorps anti-GRXS17. Les membranes ont été colorées au bleu de Coomassie (contrôle de charge).

CHAPITRE 1 :

Caractérisation phénotypique du mutant *grxs17* et étude de la relation entre la structure et la fonction de la protéine GRXS17 à 20°C, à 28°C et à 35°C

Ce premier chapitre est consacré à la caractérisation du mutant KO *grxs17* de l'écotype Col-0 mais aussi à l'étude des lignées complémentées par différentes versions de GRXS17 (et de GRXS14) introgressées dans *grxs17*. Pour les deux parties de ce chapitre, le but était de comprendre la (ou les) fonction(s) de la protéine GRXS17 chez la plante. La croissance de la plante est au cœur de ce chapitre puisque le mutant présente des défauts de croissance ce qui suggère une fonction dans cette dernière (Cheng et al., 2011a; Knuesting et al., 2015). Les études ont été réalisées à des températures normales (20°C) et plus élevées (28°C ou 35°C). En effet, les défauts de croissance observés sont aggravés à 28°C. Cette observation suggère que GRXS17 pourrait également avoir un rôle dans la réponse à l'augmentation de la température. C'est dans ce sens que des essais à 35°C ont également été effectués. De manière globale, la compréhension du rôle de GRXS17 à de plus hautes températures est au cœur des trois chapitres. Nous avons d'abord voulu savoir si *GRXS17* était induit en réponse à l'augmentation de la température comme cela a déjà été montré 24h à 28°C sur des plantules de 10 jours (Cheng et al., 2011a) mais aussi si la protéine était plus exprimée dans ces conditions. Pour cela, les niveaux de transcrits et de protéines ont été suivis sur des plantes qui ont poussé 14 jours à 20°C et à 28°C et qui ont subi différents traitements thermiques à 28°C et à 35°C (Figure 29). Fait surprenant, dans nos conditions, *GRXS17* n'est pas induit en réponse à un traitement thermique de 28°C et de 35°C dans nos plantules plus âgées de 4 jours par rapport aux données publiées (Figure 29A). Les accumulations des transcrits de *GRXS17* lors des traitements thermiques sont globalement identiques ou inférieures à l'accumulation des transcrits de *GRXS17* à 20°C et le niveau de protéine ne semblent pas également varier de façon importante, seul le point 72 h à 35°C présente une accumulation de protéine par rapport à 20°C (Figure 29B). Pour conclure, dans nos conditions expérimentales, les transcrits *GRXS17* ne sont pas sur-accumulés en réponse à l'augmentation de la température, ils semblent même être sous-accumulés et les niveaux relatifs de protéines GRXS17 semblent ne pas varier de façon importante, ce qui laisse supposer une absence de régulation traductionnelle et/ou post-traductionnelle de GRXS17.

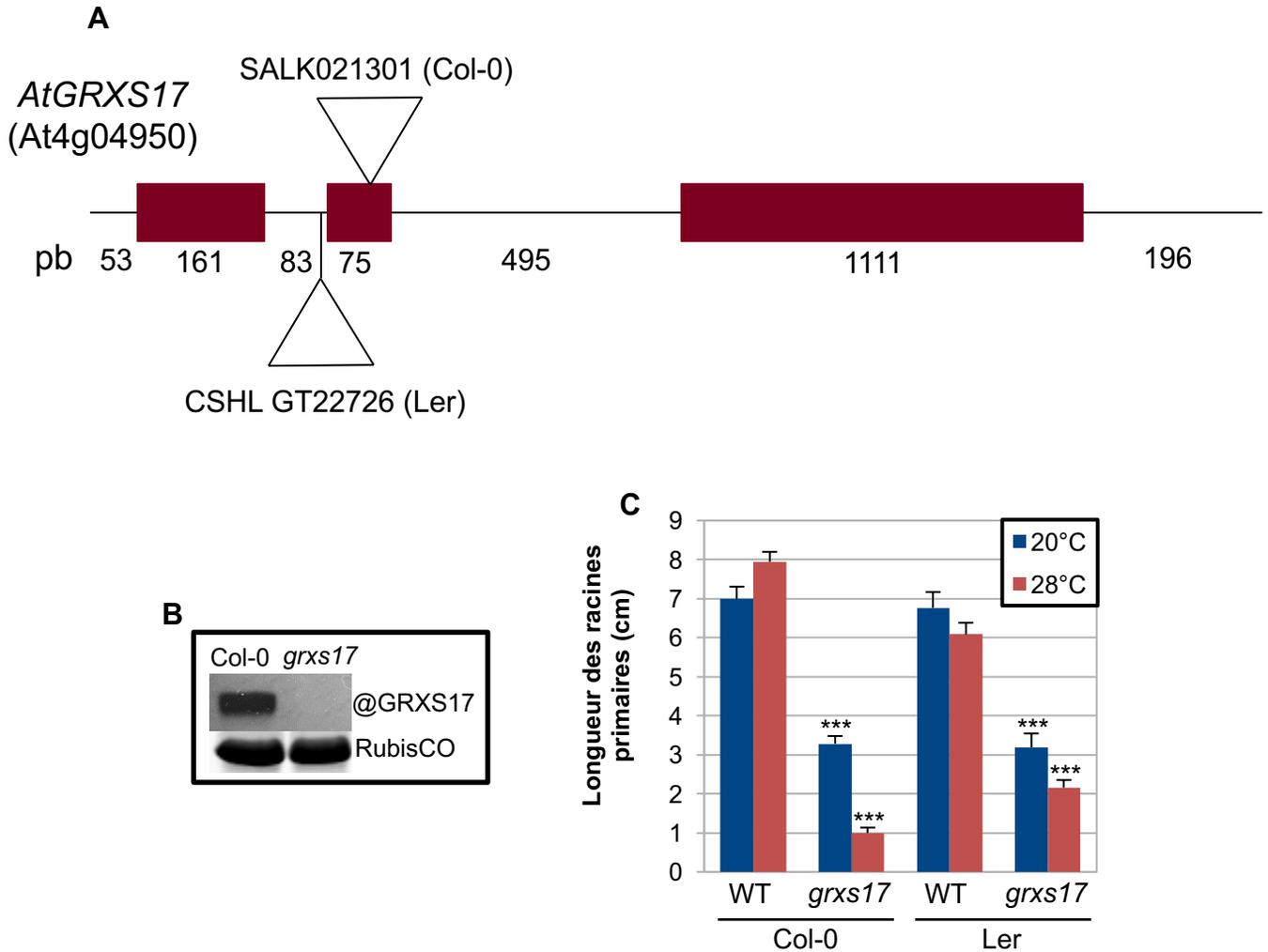


Figure 30 : Présentation des mutants *grxs17* KO par insertion d'ADN-T dans les écotypes Ler et Col-0.

A. Représentation de la séquence d'*ATGRXS17* avec les sites d'insertion des deux mutants KO *grxs17* par insertion d'ADN-T chez Ler d'une part et chez Col-0 d'autre part. Les rectangles représentent les exons, les traits les introns et les chiffres représentent leur taille (en pb). **B.** Western Blot à partir d'extraits de plantules entières de Col-0 et de *grxs17* (Col-0) ayant poussé 12 jours dans des conditions classiques de culture à 20°C. Pour chaque condition, 15µg de protéines ont migré sur un gel SDS-Page dans des conditions classiques et l'anticorps anti-GRXS17 a été utilisé. En parallèle, un second gel SDS-Page a été fait dans les mêmes conditions et coloré avec du bleu de Coomassie pour révéler la RubisCO (contrôle de charge). **C.** Les plantules de Col-0, Ler et les deux mutants *grxs17* des deux écotypes ont poussé dans les mêmes conditions que précédemment à 20°C et à 28°C. Les racines primaires de ces plantules ont été mesurées et les longueurs sont représentées sur le graphique. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; une p-value inférieure à 0,001 est représentée par *** pour la comparaison avec le WT (Col-0 ou Ler).

I. Caractérisation phénotypique du mutant *grxs17* :

Pour cette étude, le mutant *grxs17* de l'écotype Col-0 a été utilisé, il est présenté dans la figure 30. C'est le mutant d'insertion d'ADN-T SALK021301 dans le deuxième exon du gène *GRXS17* de l'écotype Col-0 (Figure 30A). L'absence de la protéine GRXS17 a été vérifiée par Western Blot (Figure 30B). Pour valider le phénotype provoqué par la mutation de *GRXS17*, le mutant *grxs17* d'un autre écotype a également été étudié. Il s'agit du mutant d'insertion d'ADN-T CSHLGT22726 dans le deuxième intron du gène *GRXS17* de l'écotype Ler (Figure 30A). Les longueurs des racines primaires de plantules de 12 jours de Col-0, Ler et des deux mutants de *grxs17* ayant poussé à 20°C et à 28°C ont été mesurées (Figure 30C). A 20°C, pour les deux écotypes, les longueurs moyennes des racines primaires sont deux fois plus petites que les WT respectifs. A 28°C, la longueur moyenne des racines primaires est 8 fois moins importante pour *grxs17* (Col-0) par rapport au WT. La croissance racinaire du mutant *grxs17* de Ler est moins affectée puisque la longueur moyenne de ses racines primaires est seulement 3 fois moins importante que le WT de Ler, mais la croissance de la plantule reste affectée dans ce mutant à 28°C. Pour conclure, ces données montrent que les deux mutants KO *grxs17* dans les deux fonds génétiques sont affectés au même niveau pour la croissance de la racine primaire à 20°C et à 28°C, ce qui confirme le rôle de la protéine GRXS17 dans la croissance et le développement de la racine en conditions normales de croissance (20°C) et à plus haute température (28°C). Par la suite, toutes les expériences ont été menées sur un seul des écotypes à savoir Col-0.

Un des objectifs de cette thèse était de comprendre la fonction, encore non élucidée, de GRXS17 dans la croissance de la plante dans ces deux conditions de températures. La première étape a donc été de caractériser phénotypiquement le mutant sous différentes conditions. Les études qui ont été réalisées sur le mutant *grxs17* de l'écotype Col-0, se sont essentiellement focalisées sur la croissance de la racine primaire. La croissance foliaire, elle aussi affectée chez *grxs17*, a également été analysée, mais de façon moins poussée.

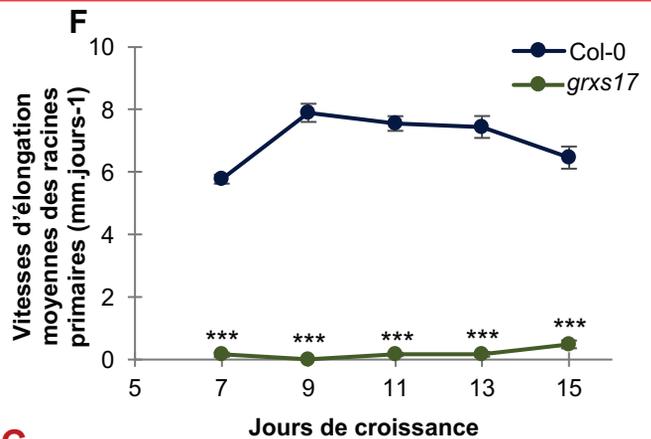
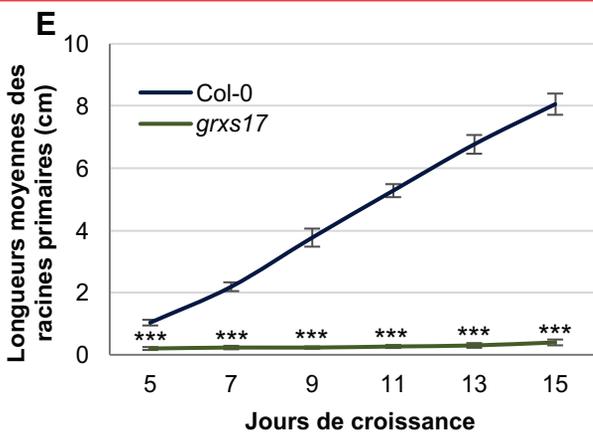
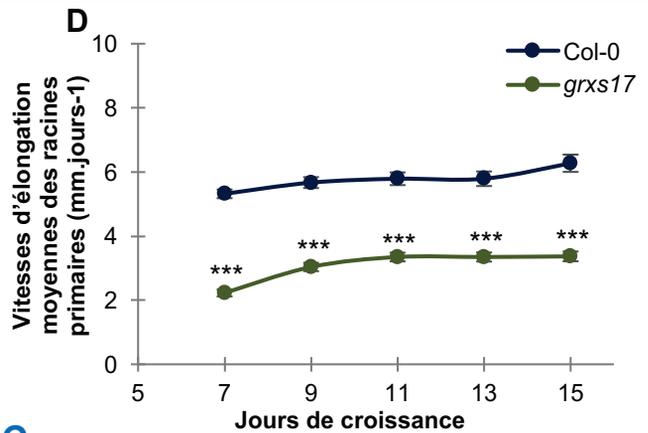
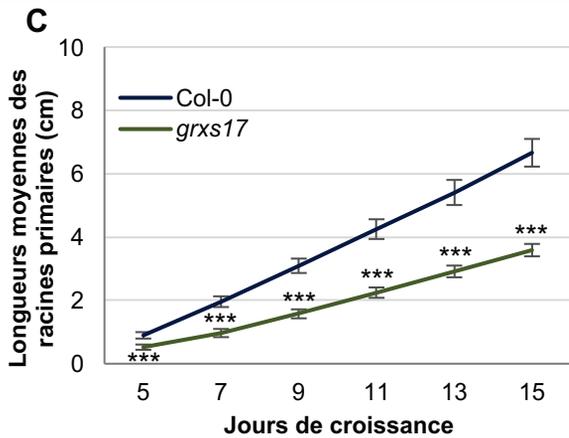
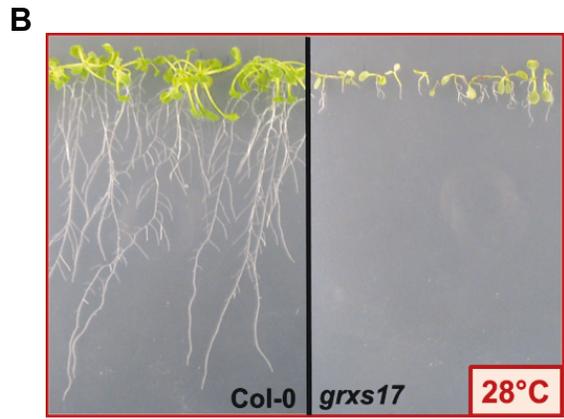
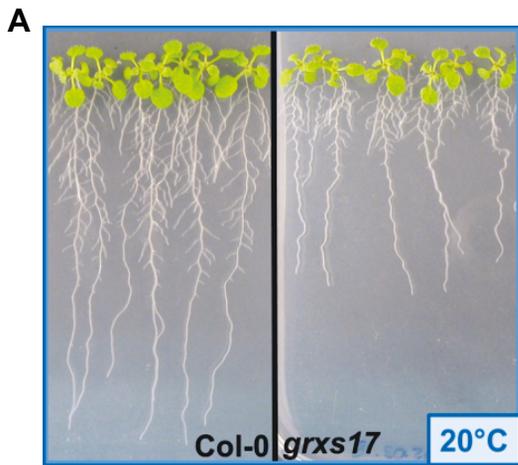
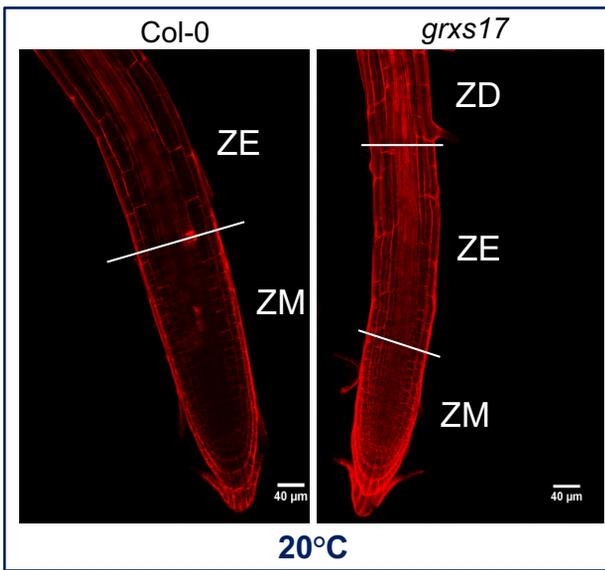


Figure 31 : Analyses de la croissance racinaire du mutant *grxs17* à 20°C et à 28°C.

Photos de plantules Col-0 et *grxs17* ayant poussé 12 jours à 20°C (A) et à 28°C (B). Mesure des longueurs moyennes et des vitesses d'élongation moyennes (en mm.jours⁻¹) des racines primaires de Col-0 et de *grxs17* de plantules âgées de 15 jours à ces deux températures (C-F). Les photos A-B et les mesures C-F ne sont pas issues de la même expérience, il s'agit de deux expériences indépendantes. Les plantules ont poussé dans les conditions classiques de culture. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; une p-value inférieure à 0,001 est représentée par *** pour la comparaison avec Col-0.

I.1 Mesure de la croissance racinaire de *grxs17* à 20° et à 28°C :

Dans un premier temps, une cinétique de croissance des racines primaires de *grxs17* a été réalisée à 20°C et à 28°C, et comparée à celle de Col-0. La longueur finale de leurs racines primaires et leurs vitesses d'élongation ont été mesurées à 15 jours de croissance (Figure 31). A 20°C, les plantules de *grxs17* possèdent une longueur de la racine primaire deux fois plus petite que l'écotype contrôle Col-0 (Figure 31C). Ceci est confirmé par une vitesse d'élongation deux fois plus petite (Figure 31D). Même si aucune mesure n'a été faite, il a été observé que la croissance des racines secondaires était également diminuée (voir les photos sur la Figure 31A). Plus généralement, c'est l'ensemble de l'appareil racinaire de *grxs17* qui est deux fois moins développé que celui de Col-0 (Figure 31C et D). A 28°C, les graines du mutant germent, mais les plantules ne se développent pas même après 15 jours de croissance (Figure 31B). Globalement, seule la radicule, l'hypocotyle et les cotylédons émergent, puis le développement s'arrête, les feuilles ne se forment. La croissance racinaire est arrêtée à cette température chez *grxs17* contrairement à Col-0 qui se développe normalement (Figure 31E). La vitesse d'élongation moyenne de la racine primaire de *grxs17* est proche de zéro (Figure 31F). Il est également intéressant de noter que la vitesse d'élongation de Col-0 est en moyenne plus élevée à 28°C par rapport à 20°C (respectivement 7,1 mm.j⁻¹ et 5,8 mm.j⁻¹) (Figure 31D et F). Pour conclure, GRXS17 est donc impliquée dans la croissance de la racine primaire et plus généralement dans la croissance de l'appareil racinaire mais également dans l'adaptation de la croissance de ce dernier à des températures plus élevées.

A

	Col-0	<i>grxs17</i>
Zone méristématique (μm)	321 ± 31	275 ± 22
Zone d'élongation (μm)	767 ± 111	835 ± 213

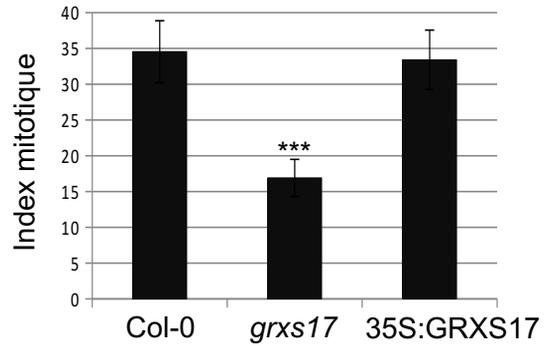
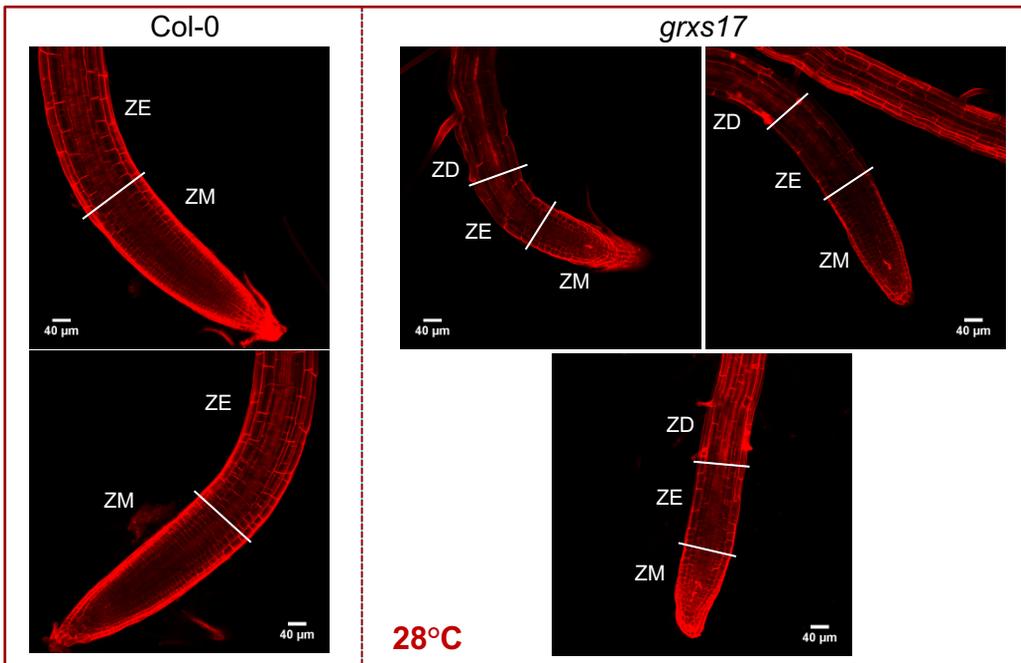
**B**

Figure 32 : Etude de la croissance des racines primaires de Col-0 et *grxs17* via l'activité du méristème apical racinaire (MAR).

A. A gauche, photos représentatives de la racine primaire de plantules de Col-0 et *grxs17* ayant poussé à 20°C. Leurs racines ont été colorées à l'iodure de propidium afin de visualiser les cellules de la racine et de mesurer les différentes zones. A droite, longueur moyenne (en μm) de la zone méristématique et de la zone d'élongation et étude de l'activité mitotique de Col-0, de *grxs17* et de la lignée complétementée 35S:GRXS17 (17) par calcul de l'index mitotique de ces deux derniers. Les racines sont cette fois-ci colorées avec une solution de DAPI et de triton afin de colorer l'ADN et de visualiser les cellules en division. Les cellules en division sont comptées dans chaque racine, et les valeurs moyennes calculées sur l'ensemble des racines sont représentées sur le graphe. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; une p-valeur inférieure à 0,001 est représentée par *** pour la comparaison avec Col-0. **B.** Photos représentatives de la racine primaire de plantules de Col-0 et *grxs17* ayant poussé à 28°C.

I.2 Observation du méristème racinaire du mutant *grxs17* :

La croissance racinaire est clairement impactée chez le mutant à des températures normales. Un des éléments essentiels à la croissance racinaire pouvant être affecté dans *grxs17* et expliquer ce défaut de croissance, est le méristème apical racinaire (MAR) (se référer au I.2.1 de l'introduction et aux Figures 2 et 3). Nous avons donc entrepris d'étudier l'activité du MAR par l'observation de la structure des racines primaires. Deux des trois zones de la racine primaire de Col-0 et *grxs17* ont été étudiées, il s'agit de la zone méristématique et la zone d'élongation à 20°C (Figure 32A). Pour cela, les racines primaires ont été colorées à l'iodure de propidium : il permet de visualiser les différentes couches cellulaires de la racine et colore les membranes. De plus, il permet de vérifier l'état de viabilité des cellules en pénétrant dans les cellules mortes qui ont perdu leur intégrité membranaire. Les longueurs (en μm) de ces deux zones ont été mesurées et les valeurs moyennes sont représentées dans la figure 32A. A 20°C, la zone méristématique est plus petite chez le mutant, elle est en moyenne 14% inférieure à celle de Col-0. Ceci suggère une défaillance au niveau de la zone méristématique. A l'inverse, la zone d'élongation des racines primaires de *grxs17* est en moyenne 8% plus grande que celle du contrôle. La zone méristématique (ZM) du mutant est probablement moins riche en cellules que celle du Col-0. Cette zone regroupe la réserve de cellules souches et les cellules se divisant par mitose (Figure 2). Afin de savoir si le mutant présente un défaut de division mitotique, l'index mitotique de cette zone a été mesuré (Figure 32B). Le mutant présente en moyenne un index mitotique deux fois moins élevé que le Col-0, ce qui suggère que le défaut de croissance de celui-ci provient peut-être d'une diminution de l'activité mitotique de la zone méristématique. Pour conclure, la zone méristématique du mutant est plus petite que celle du contrôle indiquant une défaillance dans le MAR et ceci peut expliquer le retard de croissance chez le mutant. La zone d'élongation est, à l'inverse, plus grande chez *grxs17*, ceci pouvant être un mécanisme de compensation pour pallier une zone méristématique plus petite.

A 28°C, ces mesures n'ont pas encore été prises mais des photos des observations réalisées sont présentées (Figure 32B) et le méristème des racines primaires de *grxs17* semble endommagé puisque de la mort cellulaire est observé. Ceci peut expliquer le défaut sévère de croissance de *grxs17* à 28°C.

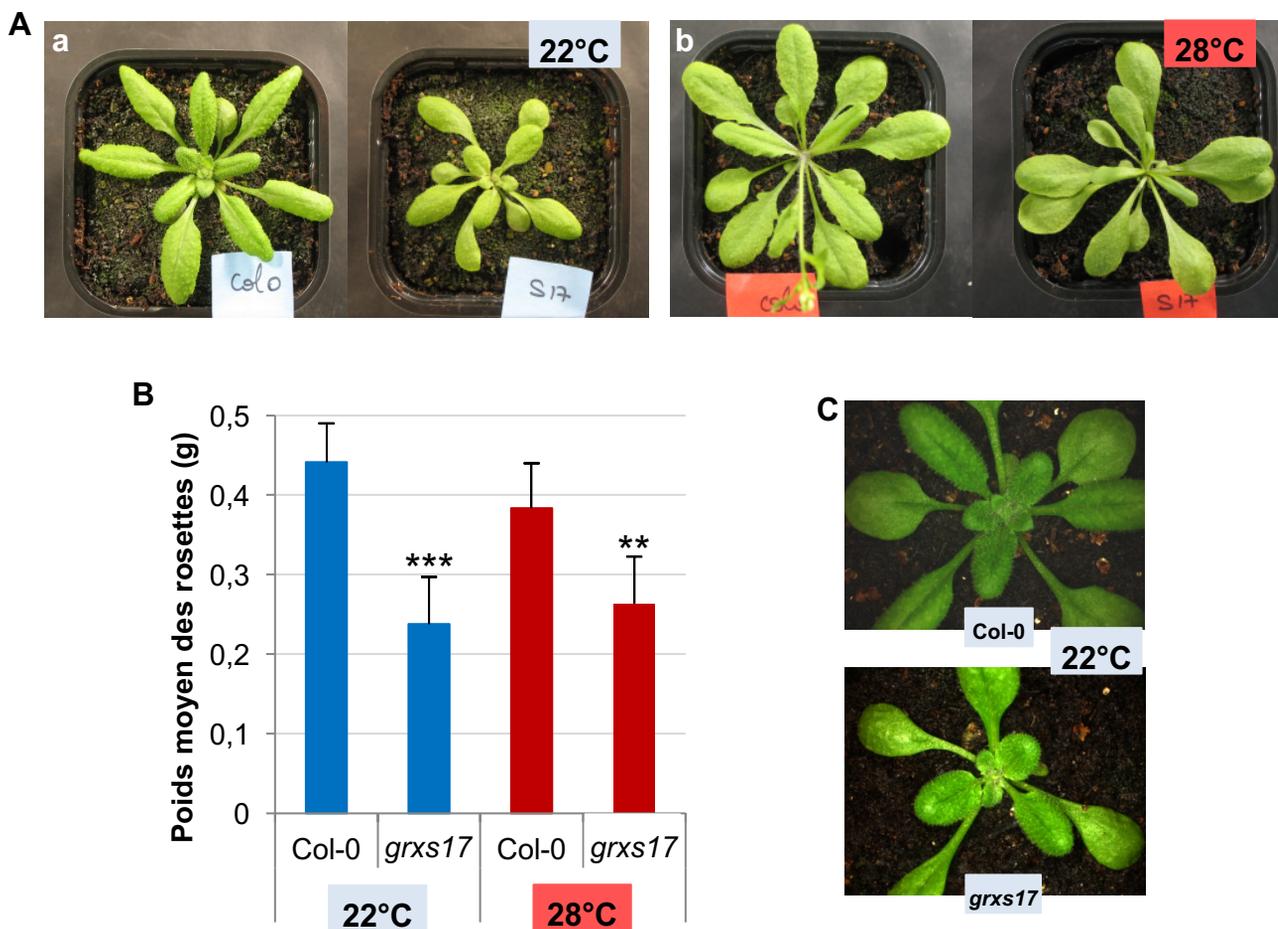


Figure 33 : Etude de la croissance foliaire du mutant *grxs17* à 22°C et à 28°C.

Les plantes de Col-0 et de *grxs17* âgées de 3 semaines ont germé et poussé pendant 2 semaines à 22°C sous des conditions de jours longs avant que la moitié ne soit transférées à 28°C. **(A)** Photos représentatives de Col-0 et de *grxs17* à 22°C **(a)** et à 28°C **(b)**. **(B)** Poids moyen des rosettes en gramme (g). Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-value inférieures à 0,01 et à 0,001 sont représentées par ** et *** pour la comparaison avec Col-0. **(C)** Répétition de la même expérience avec 12 plantes dans chaque condition. Photos représentatives de Col-0 et de *grxs17* à 22°C au bout de 3 semaines de croissance.

I.3 Etude de la croissance foliaire et de la floraison de *grxs17* à 22°C et à 28°C :

Enfin de compléter les analyses phénotypiques, la croissance foliaire et la floraison du mutant à 22°C mais aussi à 28°C ont été étudiées. La croissance foliaire a déjà été documentée en conditions normales, à 28°C et en excès de lumière (se référer au **VII.** de l'introduction) (Cheng et al., 2011a; Knuesting et al., 2015). Les essais à 22°C et à 28°C ont été reproduits sur des plantes Col-0 et *grxs17* en terreau en conditions de jours longs pendant 10 semaines. Ces plantes ont toutes poussé 2 semaines à 22°C avant que la moitié ne soit transférée à 28°C. Il était nécessaire de procéder comme cela car en terreau à 28°C les plantules *grxs17* sont très affectées et meurent très rapidement comme observé *in vitro*. Au bout de ces 3 semaines de croissance, les différences sont bien notables, comme nous pouvons l'observer sur les photos et pour la moitié des plantes en culture, les rosettes ont été récoltées et pesées (Figure 33). La taille de la rosette est plus petite chez *grxs17* par rapport au Col-0 à 22°C (Figure 33Aa). C'est aussi le cas à 28°C même si l'écart de taille semble moins prononcé (Figure 33Ab). Les rosettes du *grxs17* ont une masse moyenne deux fois moins élevée que celle du contrôle à 22°C (Figure 33B). A 28°C, cette différence est moins marquée, les rosettes du mutant ont une masse moyenne au 2/3 de celle du Col-0. Ces données à trois semaines de croissance confirment le défaut de croissance du mutant à 22°C et à 28°C. A 28°C, les résultats paraissent surprenants puisque le mutant semble moins touché qu'à 22°C. Les feuilles du mutant à 22°C et à 28°C ont un aspect différent de celles de Col-0 (Figure 33A et C). Il semblerait même qu'il y ait un problème de phyllotaxie, les feuilles adoptant une disposition irrégulière. Afin de confirmer nos différentes observations, une répétition biologique a été faite sur d'autres lots de graines. Les données sont présentées dans les Figures 33C et 34. Au bout de 3 semaines, les résultats sont identiques, le même retard est observé et perdure toute la durée de l'expérience.

La floraison est également affectée chez le mutant à ces deux températures (Figures 33 et 34). A 22°C, il n'y a pas de grande différence entre Col-0 et *grxs17* dans le temps d'apparition de la première hampe florale. Cependant la croissance des hampes secondaires semble être ralentie chez le mutant (données non montrées). La floraison apparaît à un stade foliaire différent chez le mutant c'est-à-dire à deux feuilles de moins que chez le Col-0 (données non montrées qui doivent être confirmées). *grxs17* va développer des hampes florales secondaires et des siliques contenant des graines (Figure 34Ca). A 28°C, à 4 semaines de croissance, les hampes florales primaires du Col-0 sont bien développées et apparaissent une semaine plus tôt que chez le mutant où la floraison est tardive (Figure 34A et B). A 7 semaines et demie de croissance, les hampes florales secondaires de *grxs17* sont défectueuses et la majorité des boutons floraux sont déformés en comparaison avec le contrôle

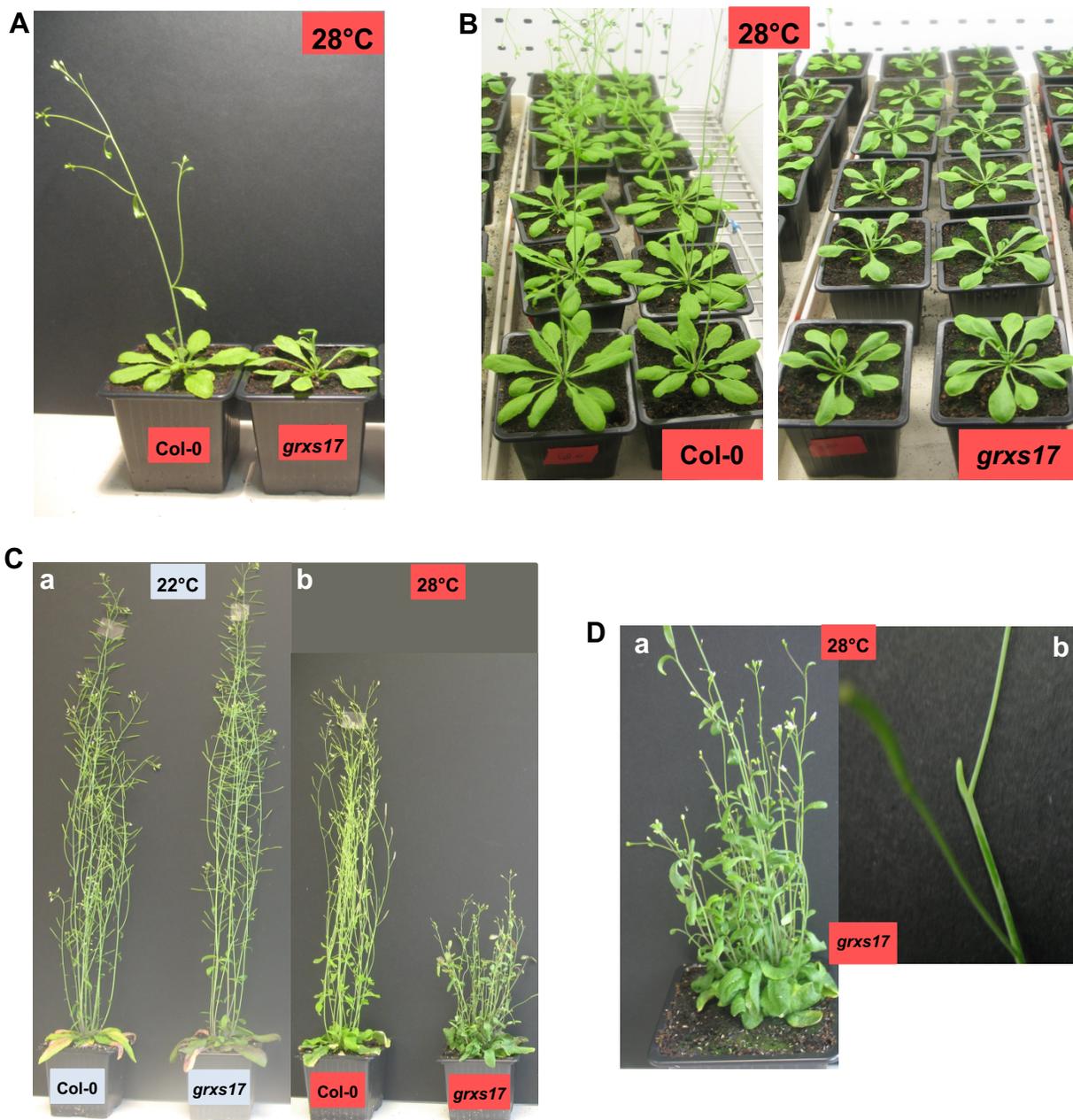


Figure 34 : Etude de la floraison du mutant *grxs17* à 22°C et à 28°C.

Répétition biologique de la croissance en terreau à 22°C et à 28°C avec 12 plantes dans chaque condition. (A et B) Photos représentatives à 4 semaines de croissance des plantes *Col-0* et *grxs17* qui ont poussé à 28°C. (C) Photos représentatives de *Col-0* et de *grxs17* âgées de 7 semaines et demie à 22°C (a) et à 28°C (b). (D) Photos représentatives des hampes florales déformées de *grxs17* qui a poussé à 28°C (a) et d'une inflorescence anormale apparaissant sur ces dernières (ressemblant au phénotype observé chez les mutants *pin* du transport de l'auxine) (b).

(nombre et structure des pétales, sépales, étamines et carpelles ; se référer à la figure 1) (Figure 34**Cb** et **D**). Dans quelques cas, de minuscules tiges apparaissent à la place des boutons floraux comme cela a été observé pour certains mutants *pin*, protéines intervenant dans le transport de l'auxine (Figure 34**Db**) (Gälweiler et al., 1998). Nous pouvons également observer une perte de la dominance apicale de *grxs17* à 28°C puisqu'il produit beaucoup de hampes florales secondaires (Figure 34**Cb** et **Da**). Au bout de 10 semaines, les graines de ces plantes sont récoltées ce qui permet de constater qu'à 28°C les siliques mal formées produites par le mutant ne contiennent aucune graine à l'inverse de Col-0 (données non montrées). Pour conclure, la floraison et la mise à fleurs de *grxs17* sont fortement impactées à 28°C. Le mutant produit des hampes défectueuses contenant des boutons floraux déformés et des siliques dépourvues de graines, il est donc stérile à cette température.

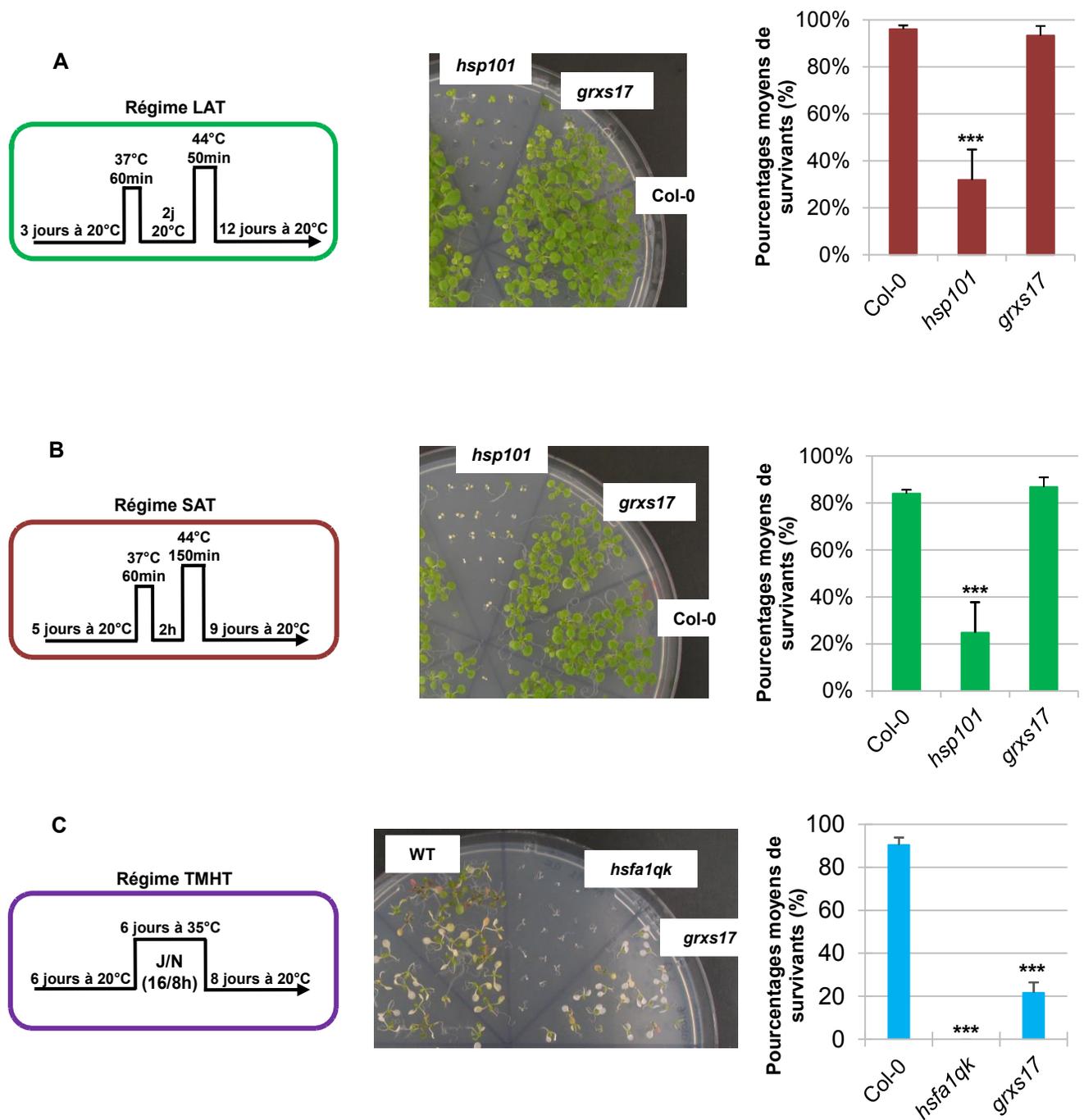


Figure 35 : Essais de thermotolérance sur *grxs17* : application des régimes SAT, LAT et TMHT.

Les plantules germent et poussent sur un milieu MS avec 0,1% de saccharose et selon les régimes LAT (A), SAT (B) et TMHT (C). Les pourcentages moyens de survivants après ce régime ont été calculés ; les survivants étant les plantes ayant retrouvé une croissance foliaire normale. Pour chacun des régimes, un contrôle positif a été utilisé : il s'agit du mutant *hsp101* d'une part (A et B) et du quadruple mutant *hsfa1qk* de 4 HSFA1s (HSFA1a, HSFA1b, HSFA1d et HSFA1e) d'autre part (C). Ces expériences ont été répétées biologiquement 3 fois avec une moyenne de 20 ou 40 plantules par boîte et 2 boîtes par répétitions ou plus pour la TMHT. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; une p-value inférieure à 0,001 est représentée par *** pour la comparaison avec le Col-0.

I.4 Mesure de la thermotolérance de *grxs17* après l'application des régimes thermiques de type LAT, SAT et TMHT :

Les résultats précédents montrent l'importance de GRXS17 dans la croissance de la plante à des températures élevées. En parallèle, nous avons voulu savoir si GRXS17 était également impliquée dans la thermotolérance, c'est-à-dire dans la résistance de la plante face à des stress thermiques. Comme cela a été évoqué dans l'introduction, il existe différents régimes thermiques pour étudier la thermotolérance (se référer à la partie III.5. de l'introduction et à la figure 15). Afin de mesurer la thermotolérance de *grxs17*, les régimes thermiques de type SAT, LAT et TMHT ont été appliqués et les pourcentages moyens de survivants ont été calculés (Figure 35). Une plante est considérée comme survivante lorsqu'elle reprend sa croissance foliaire après l'application de ces régimes. Ce pourcentage est calculé 8 jours après l'application des 6 jours à 35°C. Les plantules ont souvent été observées au-delà (jusqu'à 20 jours après) pour valider qu'une plante considérée comme morte (pas de reprise de croissance foliaire) est bien morte. Pour finir, la moyenne d'au moins deux répétitions permet de calculer le pourcentage moyen de survivants. Certains des résultats des mesures de la thermotolérance sont également présentés dans l'article du chapitre 2, que nous avons soumis pour publication.

L'emploi de lignées contrôles permet de valider les tests de thermotolérance, *Hsp101* connu pour être très sensible à un stress de type SAT et LAT, et le mutant *hsfa1qk* (KO pour 4 HSFA1 (a, b, d et e)) utilisé lors des tests de TMHT. Après l'application de régimes thermiques courts de type SAT et LAT, le mutant positif *hsp101* est bien sensible à ces régimes (Figure 35A et B). Ce n'est pas le cas de *grxs17* qui présente des pourcentages moyens de survivants proches du contrôle Col-0. GRXS17 ne semble donc pas impliquée dans la résistance à des stress courts de type LAT et SAT. Parmi les régimes thermiques courts étudiés, le régime BT a également été testé. Malgré différentes adaptations de protocole, nous n'avons pas réussi à obtenir de résultats probants, le contrôle positif *hsp101* n'étant pas affecté par ce régime lors de nos essais. Pour des stress longs de type TMHT, les plantules du contrôle positif *hsfa1qk* ne résistent pas (Figure 35C). Les plantules de *grxs17* sont également sensibles à ce stress puisque leur pourcentage moyen de survivants est de 21% contre 90% pour Col-0. GRXS17 semble donc spécifiquement impliquée dans le mécanisme de résistance de la plante à des stress longs d'intensité faible, de type TMHT.

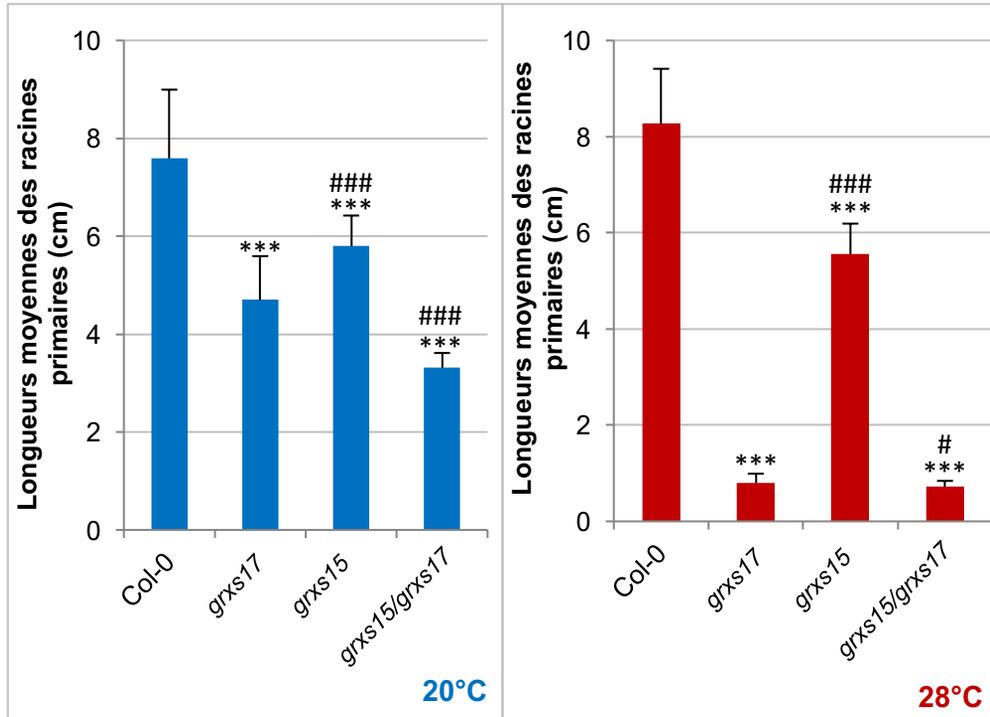


Figure 36 : Etude des longueurs des racines primaires du mutant *grxs15^{KD}* et du double mutant *grxs15^{KD}grxs17*.

Longueurs moyennes (en cm) des racines primaires des plantules ayant poussé 12 jours à 20°C et à 28°C. Longueurs moyennes d'une (*grxs15^{KD}* et *grxs15^{KD}grxs17*) ou trois répétitions biologiques, chacune contenant deux réplicats techniques. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-value inférieures à 0,05 et à 0,001 sont représentées par * et *** ou # et ### pour la comparaison avec Col-0 (*) ou avec *grxs17* (#).

I.5 Caractérisation du mutant *grxs15^{KD}* et du double mutant *grxs15^{KD}grxs17* :

Nous avons également décidé de caractériser le mutant d'une autre GRX de classe II, il s'agit de la protéine mitochondriale GRXS15. Pour cela, le mutant *grxs15^{KD}* (knockdown) a été utilisé car le mutant KO est embryon-létal (Moseler et al., 2015; Ströher et al., 2016). *grxs15^{KD}* présente également un défaut de croissance de la racine primaire à 20°C et à 28°C mais moins prononcé que *grxs17* (Figure 36). A ces deux températures, les longueurs moyennes des racines primaires de *grxs15^{KD}* sont intermédiaires à celles de Col-0 et de *grxs17*. Nous nous sommes demandés si ces deux protéines GRXS15 et GRXS17 étaient impliquées dans la même voie (phénomène d'épistasie) puisqu'elles présentent toutes les deux un défaut de croissance de la racine primaire. Pour répondre à cela, le double mutant *grxs15^{KD}grxs17* a été généré et les longueurs des racines primaires ont été mesurées à 20°C et à 28°C. Dans les deux cas, le double mutant a une longueur moyenne de racine primaire plus petite que le simple mutant *grxs17*. La double mutation semble aggraver le phénotype de croissance de la racine primaire. Ces deux protéines n'agissent à priori pas dans la même voie, il n'y a donc pas d'épistasie.

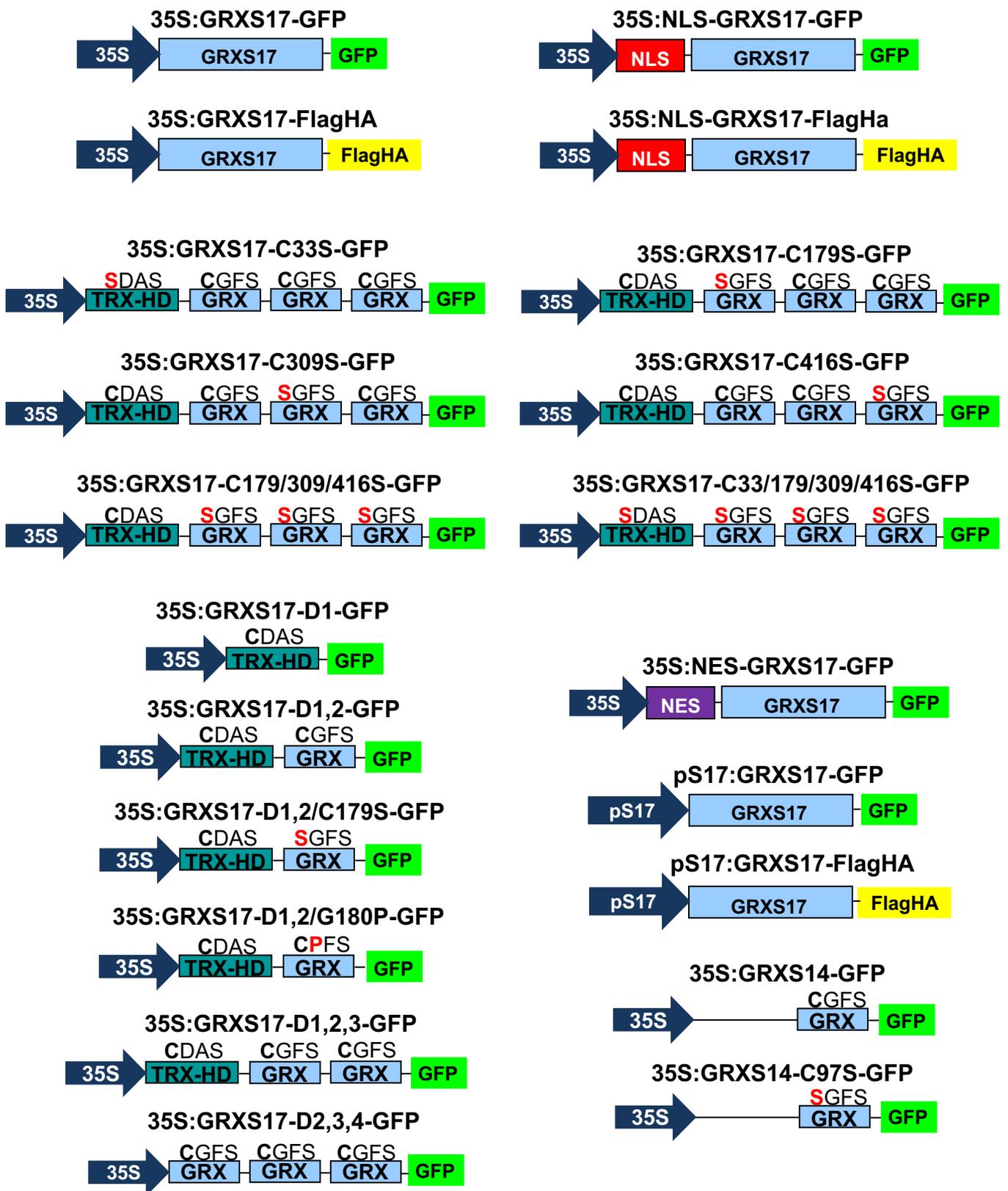


Figure 37 : Présentation des différentes lignées complémentées.

Pour générer des lignées complémentées, les gènes ont été clonés soit dans le vecteur pCAMBIA1302 (GFP en C-terminal), soit dans un vecteur pCAMBIA 1300 modifié portant une séquence Flag-Flag-HA à l'extrémité C-terminale. Ces plasmides ont été transférés dans *Arabidopsis thaliana* dans *grxs17* (Col-0) via la souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

II. Etude structure/fonction de la protéine GRXS17 par l'utilisation de lignées complémentées :

L'objectif principal de cette thèse était de rechercher le rôle de GRXS17 chez la plante lors de températures normales, plus élevées et également en réponse à des stress thermiques. Une des stratégies employées était de comprendre la (les) fonction(s) de GRXS17 en s'appuyant sur sa structure et sur sa localisation. En effet, la protéine GRXS17 présente plusieurs caractéristiques. Elle possède une taille assez importante par rapport aux autres glutarédoxines (≈ 12 kDa), son poids moléculaire est de 53 kDa. C'est une protéine multidomaines avec un domaine de type thiorédoxine et trois domaines de type glutaredoxine. C'est une glutarédoxine de type monothiol qui possède des sites actifs sur chacun de ces domaines de type CDAS sur le domaine TRX et CGFS sur les domaines GRXs. Enfin, elle possède une double localisation au niveau du cytoplasme et du noyau. Lors de cette approche, différentes constructions ont été faites, la plupart avant mon arrivée dans l'équipe, comme par exemple l'ajout d'un peptide NLS pour étudier son rôle dans le noyau, des délétions de différents domaines et des mutations de cystéines pour étudier leurs rôles. J'ai pu, lors de ma thèse, établir 4 de ces lignées présentées dans la figure 37, il s'agit des lignées 35S:GRXS17-C33S-GFP, 35S:GRXS17-C309S-GFP, 35S:GRXS17-C33/179/309/416S-GFP et 35S:GRXS17-D2,3,4-GFP. Pour les autres lignées déjà disponibles, une partie d'entre elles étaient à l'état d'homozygote pour l'insertion et l'autre partie hétérozygote. J'ai donc sélectionné différents transformants homozygotes pour ces dernières. Ces différentes constructions ont été pourvues d'un promoteur 35S et d'un tag GFP permettant également d'observer la localisation de la protéine au microscope confocal (ou FlagHa dans certains cas pour la recherche de cibles par immunoprécipitation, se référer au chapitre 2). Elles ont été introgressées dans le fond mutant *grxs17* (Figure 37). Nous avons décidé d'utiliser le promoteur constitutif 35S puisque nos lignées complémentées avec le promoteur natif n'ont pas abouti (Figure 53A). En effet, nous avons réussi à obtenir différents transformants pour la lignée GRXS17-GFP avec le promoteur natif de GRXS17. Seulement, nous ne détectons pas de protéines en western blot, ni de signal au microscope à épifluorescence. De plus, ces lignées ne complémentaient pas à 20°C ni à 28°C. De nouveaux essais sont en cours en augmentant la taille de la zone clonée en aval de l'ATG. Pour l'ensemble de ces lignées, j'ai vérifié leur expression en western blot, leur localisation au microscope confocal, la longueur de leur racine primaire à 20°C et à 28°C sur des plantules cultivées *in vitro* et j'ai effectué des tests de TMHT. Les taux de complémentations dans différentes conditions de croissance et de stress ont alors été étudiés et l'ensemble de ces données sont présentées dans les figures 38 à 53.

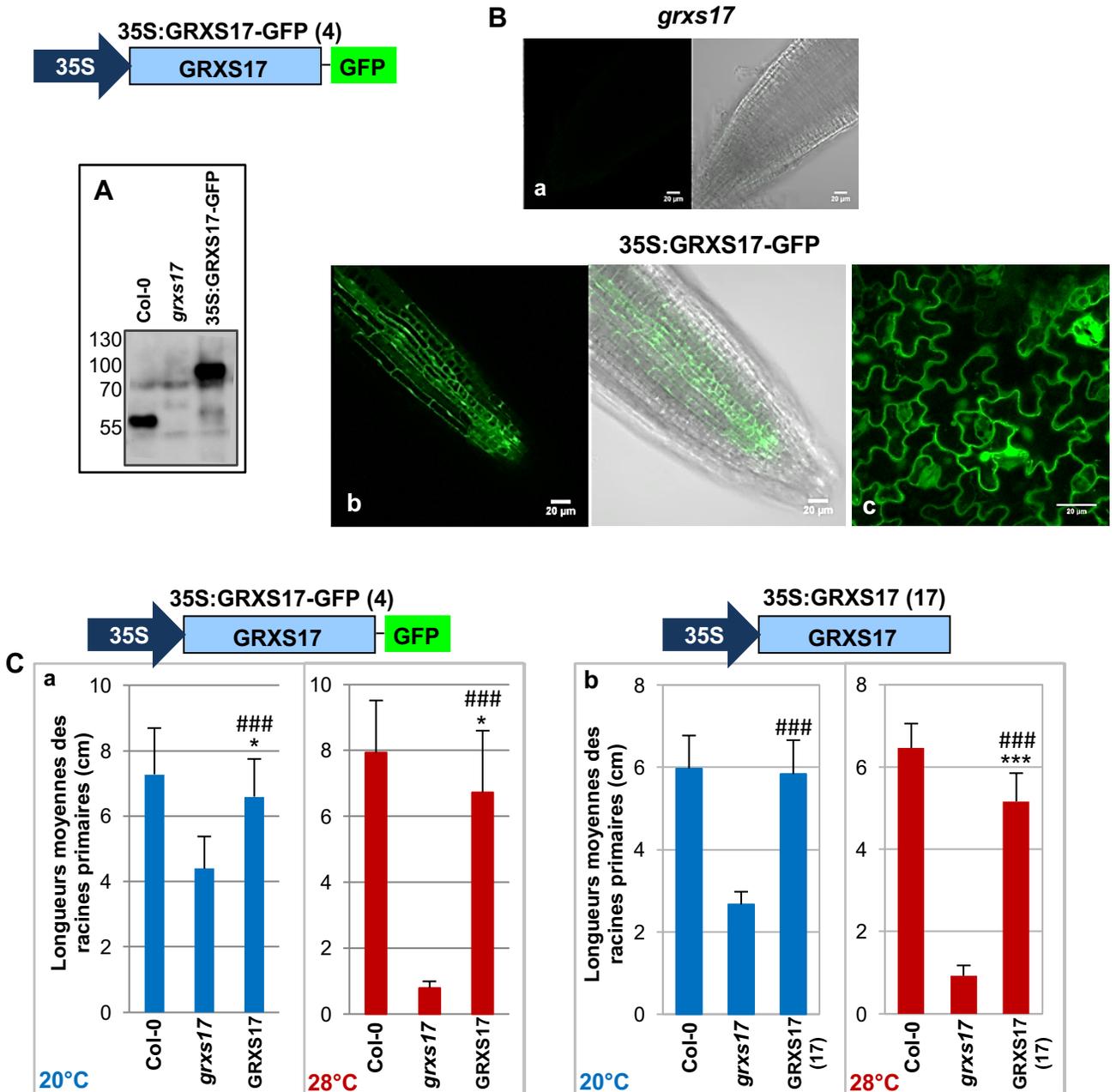


Figure 38 : Etude des lignées complémentées 35S:GRXS17-GFP (4) et 35S:GRXS17.

(A) Western blot à partir de 10µg d'extraits protéiques de Col-0, *grxs17* et de la lignée complémentée 35S:GRXS17-GFP (4) ayant poussé à 20°C durant 14 jours. Les protéines ont été détectées avec l'anticorps anti-GRXS17. La lignée 35S:GRXS17 (17) a déjà été publiée, se référer à l'article pour le western (Knuesting et al., 2015). (B) Photos représentatives de l'observation au microscope confocal de la pointe des racines primaires (a-b) et de feuilles (c) de plantules de 10 jours de *grxs17* et de 35S:GRXS17-GFP (4) excitées avec un laser à 3%. (C) Longueurs moyennes (en cm) des racines primaires de Col-0, de *grxs17*, de 35S:GRXS17-GFP (a) et 35S:GRXS17 (17) (b) ayant poussé 10 jours (pour la lignée 17) ou 12 jours à 20°C et à 28°C. Longueurs moyennes d'une (la lignée 17) à trois répétitions biologiques, chacune contenant deux à trois réplicats techniques. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-value inférieures à 0,05, à 0,01 et à 0,001 sont représentées par *, ** et *** ou #, ## et ### pour la comparaison avec Col-0 (*) ou avec *grxs17* (#).

II.1 Utilisation de lignées complémentées afin de déterminer le rôle de la localisation de GRXS17 :

II.1.1 Etude de la lignée complémentée 35S:GRXS17-GFP :

Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer que la mutation du gène GRXS17 était responsable des défauts de croissance à 20°C et à 28°C. Pour cela, *grxs17* a été complémenté par la séquence codante de GRXS17. Cette lignée complémentée est nommée 35S:GRXS17-GFP. Une autre lignée sans le tag GFP a également été étudiée, elle est nommée 35S:GRXS17 (17). Cette lignée a déjà été caractérisée et publiée (Knesting et al., 2015). Le taux d'expression de la protéine de la lignée 35S:GRXS17-GFP (4) a été mesuré par western blot avec l'anticorps anti-GRXS17 et la localisation de la protéine a été étudiée au microscope confocal (Figure 38A et B). La protéine de cette lignée s'exprime bien, elle a une expression supérieure à la protéine GRXS17 de Col-0 (Figure 38A). La protéine est localisée dans le noyau et dans le cytoplasme (Figure 38Bb-c). Les racines primaires de 35S:GRXS17-GFP (4) et de 35S:GRXS17 (17) ont été mesurées sur des plantules de 12 et 10 jours respectivement qui ont poussé à 20°C et à 28°C. La lignée 35S:GRXS17-GFP (4) complémente la croissance de la racine primaire à 20°C et à 28°C puisque ses longueurs moyennes sont proches de Col-0 et sont très significativement supérieures à *grxs17* (Figure 38Ca). C'est également le cas pour la lignée 35S:GRXS17 (17) qui complémente la longueur des racines primaires aux deux températures (Figure 38Cb).

Nous avons également voulu savoir si les phénotypes de croissance foliaire et de la floraison de *grxs17* étaient complémentés dans la lignée 35S:GRXS17-GFP (4) dans les mêmes conditions que présentées dans les Figures 33 et 34 (Figure 39). A 22°C, cette lignée semble complémenter la croissance de la rosette, ce qui se confirme avec un poids moyen des rosettes proche du Col-0 (Figure 39Aa et B). Elle complémente également la croissance florale qui est très proche de celle de Col-0 (Figure 39Ca et c). A 28°C, la lignée 35S:GRXS17-GFP (4) ne complémente pas la croissance de la rosette puisqu'elle est proche de celle de *grxs17*, comme le poids moyen de ses rosettes (Figure 39Ab et B). Au niveau de la croissance florale, la complémentation est intermédiaire puisque l'apparition de la première hampe florale est plus tardive que pour Col-0. Cependant, elle ne comporte pas (ou très rarement) des défauts comme cela est observé chez *grxs17* (Figure 39Cb et données non montrées). A 7 semaines et demie, l'appareil floral de la lignée semble similaire à celui de Col-0 (Figure 39Cd). A 28°C, les graines ont été récoltées sur seulement 3 des 8 plantes, les siliques des autres plantes étant vides. L'ensemble de ces données de croissance montrent donc que c'est bien

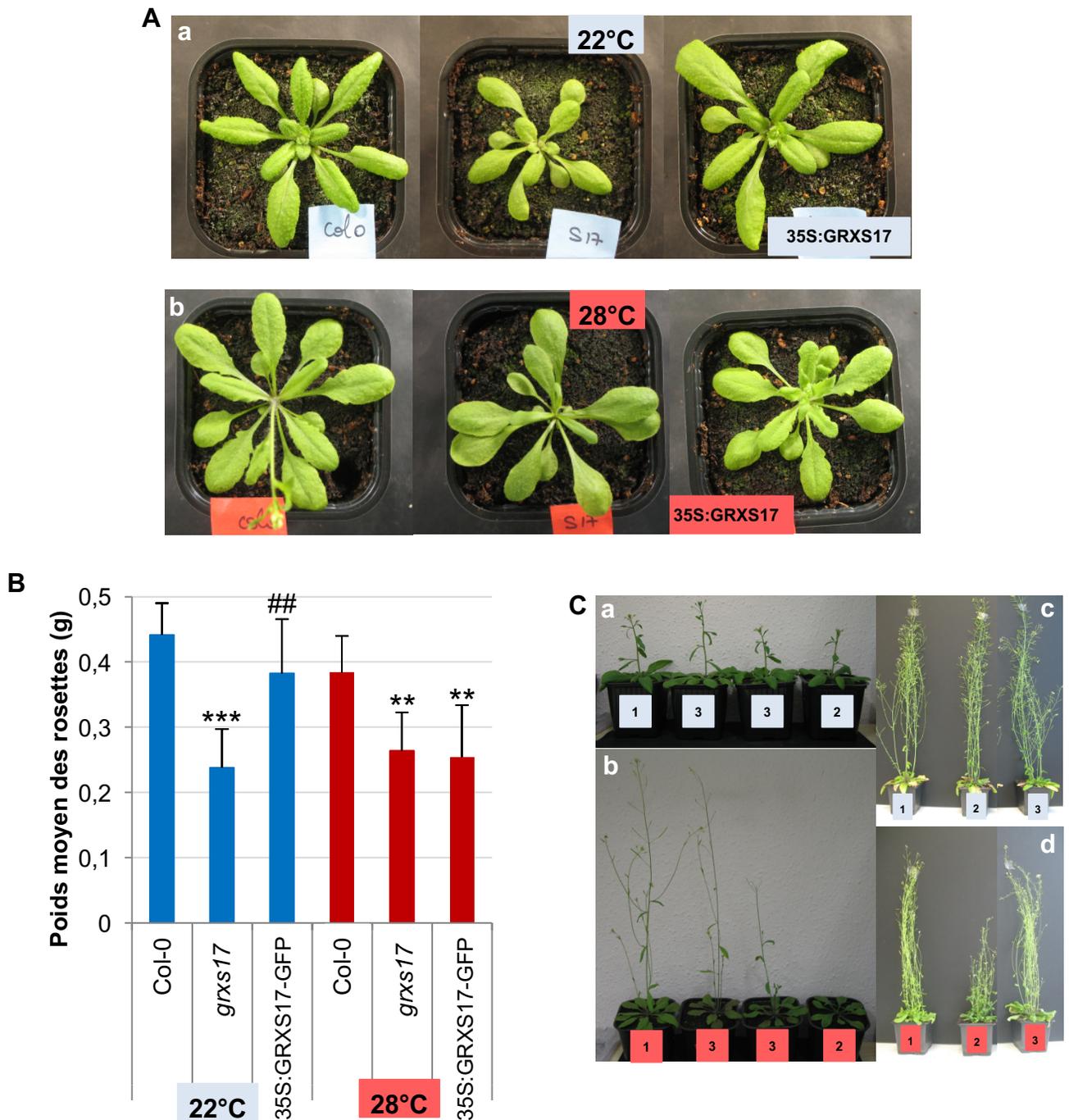


Figure 39 : Etude de la croissance foliaire et de la floraison de la lignée complétée 35S:GRXS17-GFP (4).

(A) Photos représentatives de la croissance foliaire à 3 semaines de Col-0, de *grxs17* et de 35S:GRXS17-GFP à 22°C (a) et à 28°C (b) à 3 semaines de croissance. (B) Poids moyen des rosettes en gramme (g). Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-value inférieures à 0,01 et à 0,001 sont représentées par ** et *** ou ## et ### pour la comparaison avec Col-0 (*) ou la comparaison avec *grxs17* (#). (C) Etude de la floraison de la lignée 35S:GRXS17-GFP au bout de 4 semaines de croissance à 22°C (a) et à 28°C (b) puis à 7 semaines et demi (c et d). 1: Col-0, 2: *grxs17* et 3: 35S:GRXS17-GFP.

l'absence de GRXS17 qui impacte la croissance à 20°C ou 22°C. C'est également le cas pour la croissance *in vitro* à 28°C et pour l'appareil foliaire à plus de 7 semaines. Mais dans certains cas, comme pour la taille de la rosette, l'apparition de la première hampe florale à 28°C et la production de graines, la complémentation n'apparaît pas comme totale, malgré un niveau de protéine supérieur à celui du sauvage.

35S:NLS-GRXS17-GFP

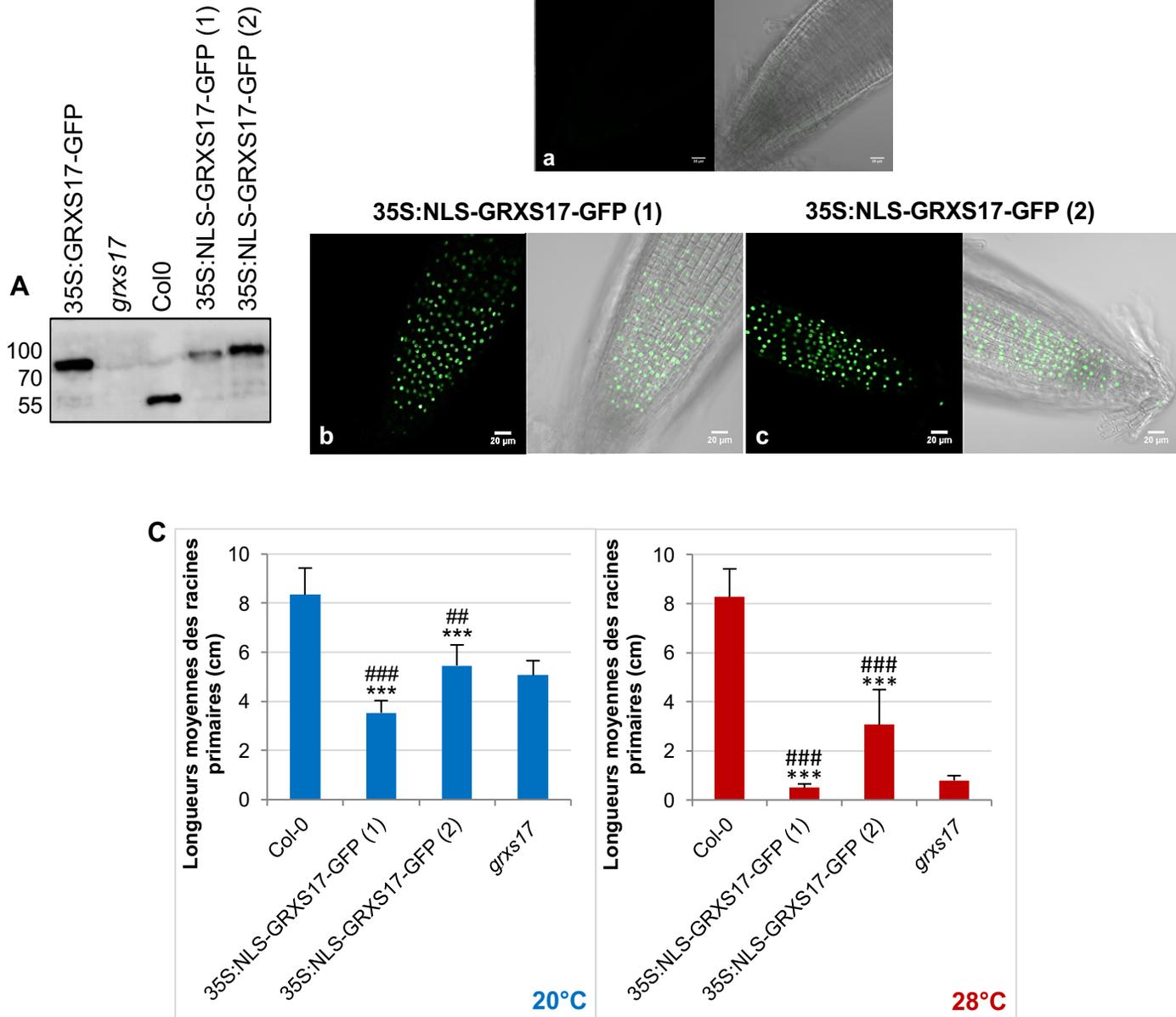


Figure 40 : Etude de la lignée complétée nucléaire 35S:NLS-GRXS17-GFP.

(A) Western blot à partir d'extraits protéiques (10 μ g) de Col-0, *grxs17* et des 2 transformants (1 et 2) de la lignée complétée 35S:NLS-GRXS17-GFP ayant poussé à 20°C durant 14 jours. Les protéines ont été détectées avec l'anticorps anti-GRXS17. (B) Photos représentatives de l'observation au microscope confocal de la pointe des racines primaires de plantules de 10 jours de *grxs17* et des 2 transformants excités avec un laser à 2% (a-c). (C) Longueurs moyennes (en cm) des racines primaires de Col-0, de *grxs17* et des 2 transformants ayant poussé 12 jours à 20°C et à 28°C. Longueur moyenne d'une (1) ou trois (2) répétitions biologiques, chacune contenant un à deux réplicas techniques. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-value inférieures à 0,01 et à 0,001 sont représentées par ** et *** ou ## et ### pour la comparaison avec Col-0 (*) ou avec *grxs17* (#).

II.1.2 Analyse de la localisation nucléaire avec la lignée 35S:NLS-GRXS17 :

Afin d'étudier le rôle de la localisation nucléaire, une lignée adressée exclusivement au noyau a été construite par l'ajout du peptide d'adressage nucléaire (NLS) du SV40, en N-terminal de la protéine de fusion GRXS17-GFP. Deux transformants indépendants ont été réalisés : 35S:NLS-GRXS17-GFP (1) et 35S:NLS-GRXS17-GFP (2). Leur niveau d'expression a été vérifié par western blot et est présenté dans la figure 40. Le niveau d'expression semble faible pour 35S:NLS-GRXS17-GFP (1) par rapport au niveau d'expression de Col-0 ou de 35S:GRXS17-GFP (4) ou du transformant 35S:NLS-GRXS17-GFP (2) qui présente lui un niveau d'expression proche de ces deux derniers (Figure 40A). Les observations au microscope confocal montrent que ces 2 transformants sont localisés dans le noyau avec un signal fort (Figure 40B). Enfin, leurs racines primaires ont été mesurées à 20°C et à 28°C (Figure 40C). Le transformant 1 ne complète pas la croissance de la racine primaire à 20°C et à 28°C puisque les longueurs moyennes de la racine primaire sont proches de celles de *grxs17*. A l'inverse, 35S:NLS-GRXS17-GFP (2) présente une complémentarité intermédiaire à ces deux températures. La lignée 35S:NLS-GRXS17-GFP (2) a un niveau d'expression proche des contrôles. Nous avons donc retenu cette dernière pour la suite des analyses. Pour conclure, les données sur 35S:NLS-GRXS17-GFP (2) suggèrent que la localisation nucléaire semble importante pour la croissance des racines primaires à 20°C et à 28°C, puisque la complémentarité est présente. Mais la localisation dans le cytoplasme semble jouer également un rôle puisque que la complémentarité n'est pas totale. On ne peut cependant pas écarter la possibilité que le niveau d'expression soit trop faible pour une complémentarité totale, ceci signifierait alors que seule la localisation nucléaire est importante pour la croissance à 20° et 28°C.

En parallèle, nous avons mis en place une lignée complétée contenant la protéine GRXS17 avec un peptide d'exclusion du noyau appelé NES. Le clonage a été réalisé à partir de la séquence NES de RTL2 qui a été cloné en aval de la protéine GRXS17 (Comella et al., 2008). Cette lignée 35S:NES-GRXS17-GFP a pour but d'exclure la protéine du noyau et d'étudier son rôle dans le cytoplasme (Figure 53C). Cependant, la construction n'est pas fonctionnelle et aboutie toujours une double localisation. Nous n'avons donc pas pu exploiter cette lignée qui aurait dû compléter nos analyses sur le rôle de la localisation de GRXS17.

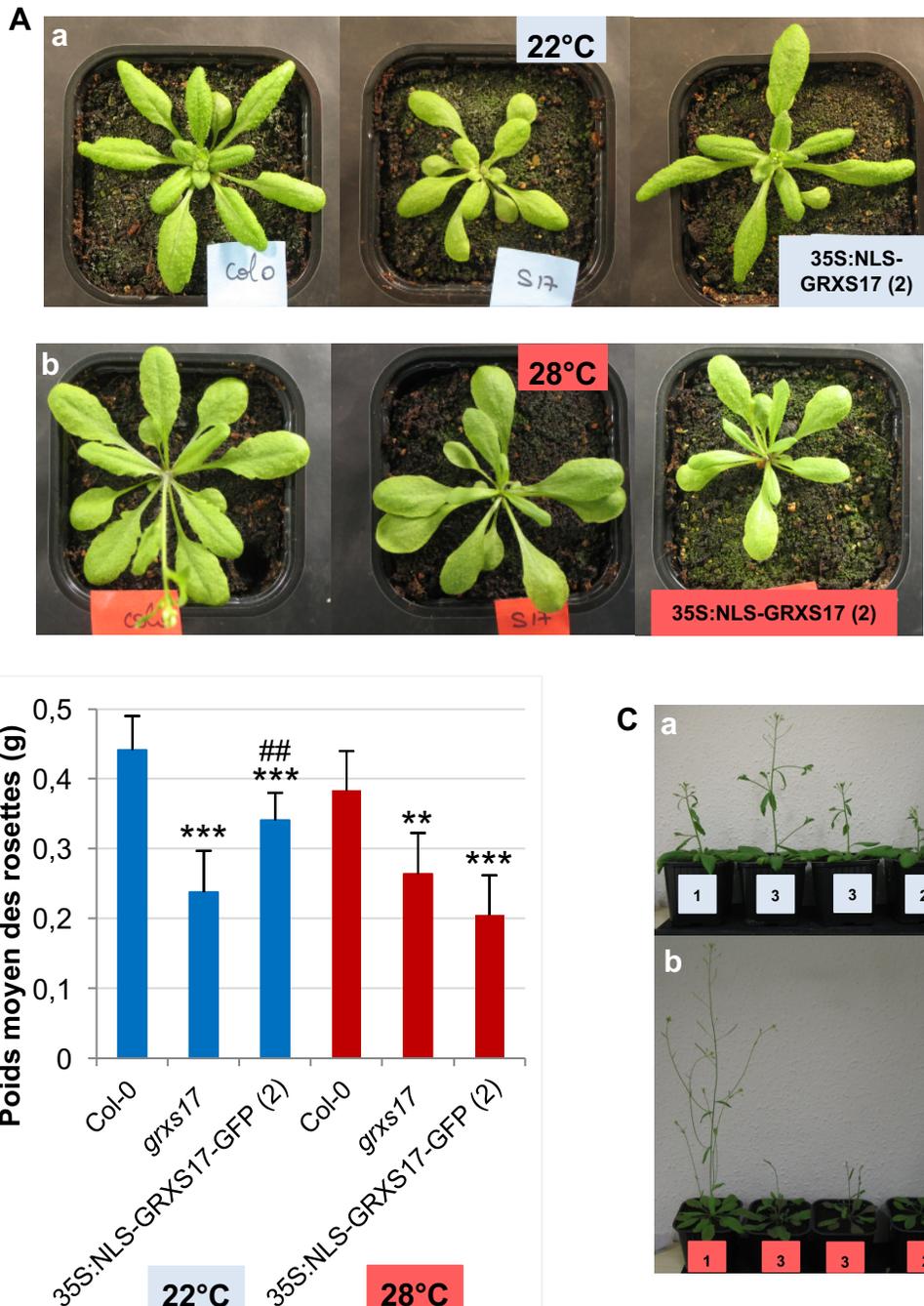


Figure 41 : Etude de la croissance foliaire et de la floraison de la lignée complétée 35S:NLS-GRXS17-GFP (2).

(A) Photos représentatives de la croissance foliaire à 3 semaines de Col-0, de *grxs17* et de 35S:NLS-GRXS17-GFP (2) à 22°C (a) et à 28°C (b). (B) Poids moyen des rosettes en gramme (g) à 3 semaines. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-value inférieures à 0,01 et à 0,001 sont représentées par ** et *** ou ## et ### pour la comparaison avec Col-0 (*) ou la comparaison avec *grxs17* (#). (C) Etude de la floraison de la lignée 35S:NLS-GRXS17-GFP (2) au bout de 4 semaines de croissance à 22°C (a) et à 28°C (b). 1: Col-0, 2: *grxs17* et 3: 35S:NLS-GRXS17-GFP (2). Il n'y a pas de répétitions biologiques pour cette lignée. Les résultats sont basés sur une seule expérience contenant 8 plantes pour chaque condition.

II.1.3 Etude du rôle de la localisation dans la croissance foliaire et la floraison à 22°C et à 28°C :

Nous avons également étudié la croissance foliaire de la lignée 35S:NLS-GRXS17-GFP (2) dans les mêmes conditions que présentées précédemment (Figure 39). A 22°C, la croissance et les poids moyens sont intermédiaires à ceux de Col-0 et de *grxs17* (Figure 41Aa et B). A l'inverse, la lignée ne complète pas la croissance de la rosette à 28°C (Figure 41Ab et B). Les rosettes semblent être en moyenne plus petites que celles de *grxs17* comme le poids moyen des rosettes. Au niveau de la floraison à 22°C, la plupart des plantes de cette lignée ont fleuri en même temps que Col-0 mais quelques unes ont fleuri plus tôt comme cela est montré dans la figure 41Ca. A 28°C, la floraison est affectée, elle est assez proche de celle de *grxs17*. Les boutons floraux sont malformés (nombre et structure des pétales, sépales, étamines et carpelles), les siliques sont plus petites et ne contiennent pas de graines (Figure 41Cb et données non montrées). Ces données sur 35S:NLS-GRXS17-GFP (2) montrent que la localisation nucléaire semble importante mais non essentielle à la croissance des rosettes à 22°C. A 28°C, la localisation cytoplasmique paraît essentielle à la croissance foliaire, dans la floraison et la mise à fleurs.

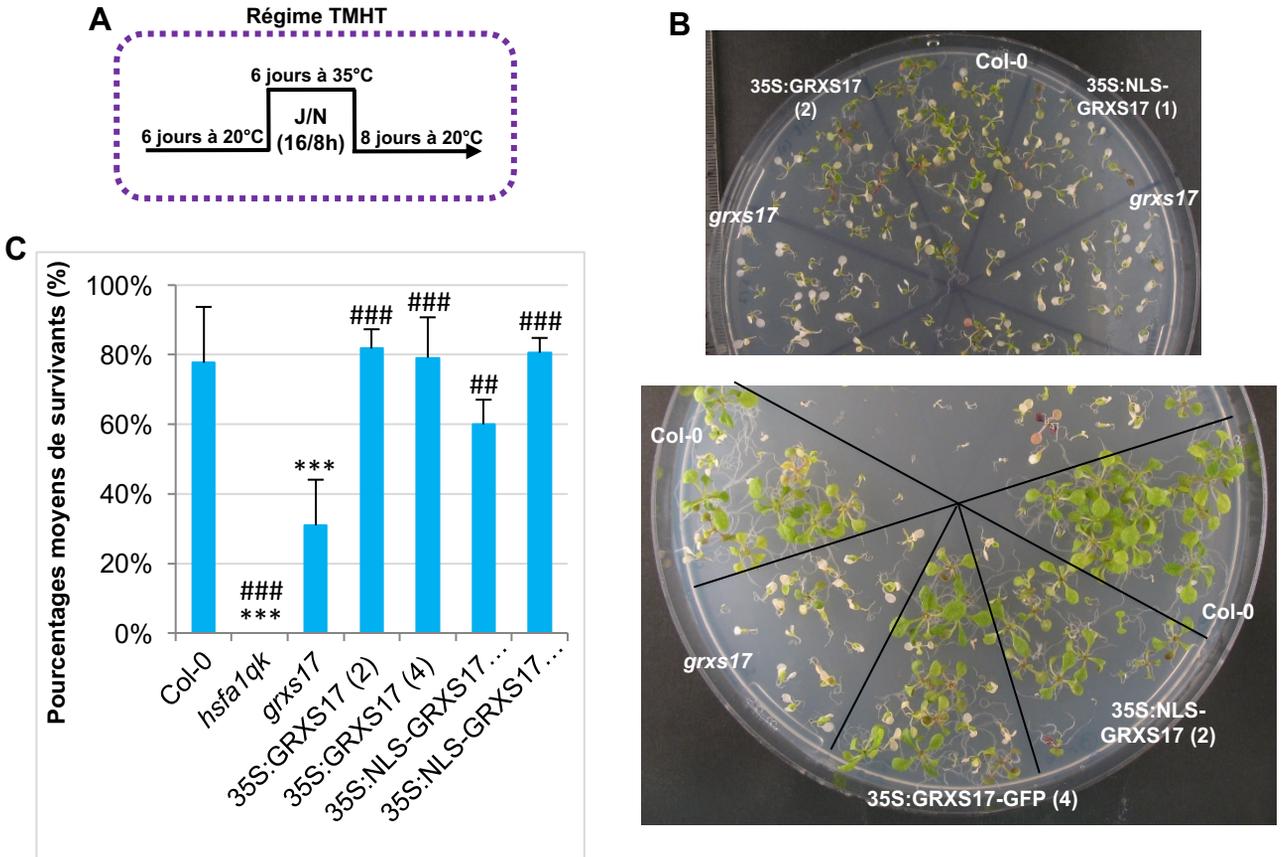


Figure 42 : Essais de thermotolérance sur les lignées 35S:GRXS17-GFP et 35S:NLS-GRXS17-GFP avec l'application du régime TMHT.

Photos représentatives des différentes plantules des lignées 35S:GRXS17-GFP (2) et (4) et 35S:NLS-GRXS17-GFP (1) et (2) (**B**) et le graphique des pourcentages moyens de survivants calculés après l'application du régime TMHT (**C**). Il s'agit de la moyenne de 1 à 3 répétitions biologiques en fonction des lignées complémentées avec une moyenne totale de réplicats techniques allant de 2 triangles (pour 35S:NLS-GRXS17 (1)) à 22 triangles pour *grxs17*. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-value inférieures à 0,01 et à 0,001 sont représentées par ** et *** ou ## et ### pour la comparaison avec le Col-0 (*) ou *grxs17* (#).

II.1.4 Rôle de GRXS17 et de sa localisation dans la thermotolérance :

Afin de confirmer l'importance de GRXS17 et notamment de sa localisation dans la thermotolérance, le régime TMHT a été appliqué sur les lignées 35S:GRXS17-GFP et 35S:NLS-GRXS17-GFP (Figure 42). Une autre lignée contrôle nommée 35S:GRXS17-GFP (2) a été ajoutée dans ces essais de thermotolérance afin de consolider nos résultats. Les différents transformants de ces lignées affichent tous des pourcentages moyens de survivants significativement plus forts que le mutant *grxs17* (Figure 42C). Les lignées 35S:GRXS17-GFP (2) et 35S:GRXS17-GFP (4) présentent respectivement un pourcentage de survivants de 82% et 79%, ce qui est supérieur à celui de Col-0 (78%). Ceci confirme que GRXS17 est important dans la résistance à des stress thermiques longs de type TMHT. Pour la lignée 35S:NLS-GRXS17-GFP, le transformant 2 a 81% de survivants, ce qui est supérieur à celui de Col-0. Pour conclure, les données des lignées 35S:GRXS17-GFP confirment que GRXS17 est impliquée dans la thermotolérance et les résultats de 35S:NLS-GRXS17-GFP (2) suggèrent que la localisation nucléaire de GRXS17 joue un rôle majeur pour conférer la thermotolérance à la plante.

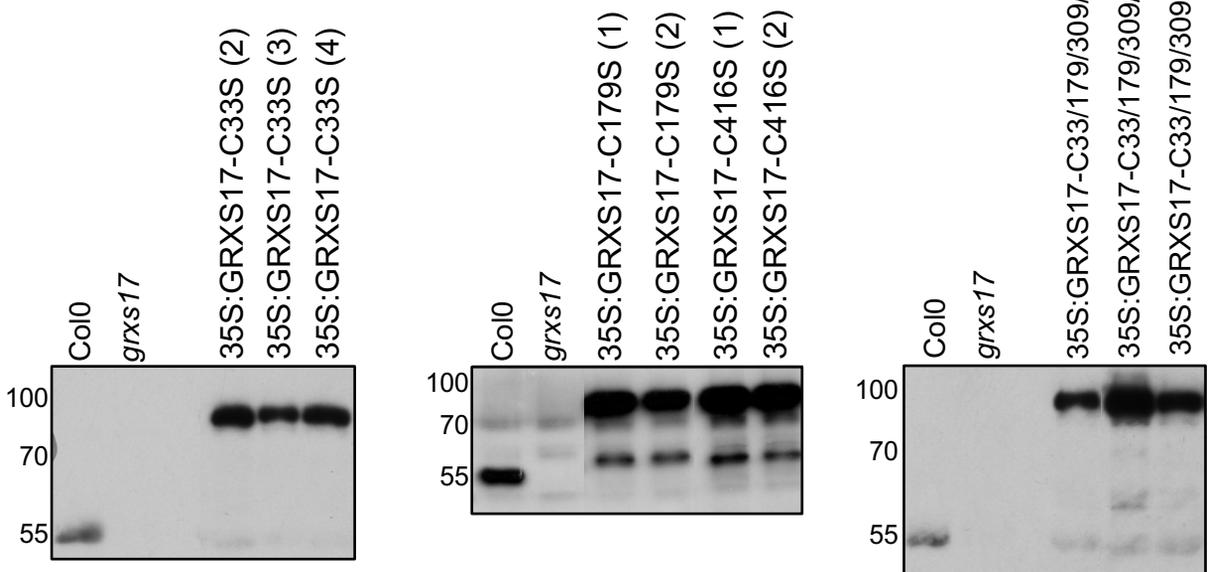
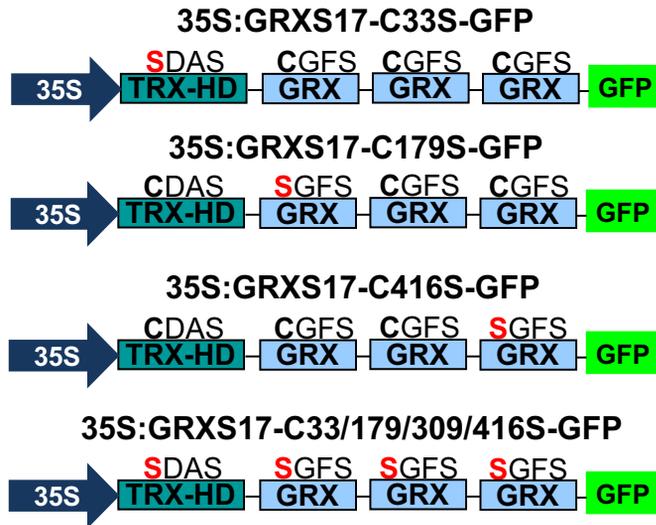


Figure 43 : Etude de l'expression protéique des lignées 35S:GRXS17-C33S, 35S:GRXS17-C179S, 35S:GRXS17-C416S et 35S:GRXS17-C33/179/309/416S.

Western blot à partir d'extraits protéiques (10µg) des différentes plantules ayant poussé à 20°C durant 14 jours. Les protéines ont été détectées avec l'anticorps anti-GRXS17.

II.2 Utilisation de lignées complémentées pour déterminer le rôle des cystéines :

II.2.1 Etude du rôle des cystéines dans la croissance racinaire :

Comme vu précédemment, GRXS17 est composée de 4 domaines contenant 4 sites actifs, un site actif de type CDAS dans le premier domaine et des sites actifs de type CGFS dans les trois autres domaines GRX. Les cystéines des sites actifs des TRX et des GRX sont primordiales dans l'accomplissement de leur fonction (se référer à l'introduction IV.2.). Pour déterminer le rôle de ces différentes cystéines dans la croissance des racines et la thermotolérance, les mêmes expériences présentées précédemment ont été menées avec des lignées complémentées mutées sur les cystéines des différents sites actifs, remplacées par une sérine (Figure 37). Les lignées 35S:GRXS17-C33S-GFP, 35S:GRXS17-C179S-GFP, 35S:GRXS17-C416S-GFP et 35S:GRXS17-C33/179/309/416S-GFP ont respectivement, une/des mutations sur la cystéine en position 33, 179, 416 et sur les quatre positions 33/179/309/416. La lignée 35S:GRXS17-C309S est en cours d'obtention mais les plantes sont encore à l'état hétérozygote (se référer à la partie II.4 de ce chapitre).

Pour chacune de ces lignées, 2 à 3 transformants ont été étudiés et leur niveau d'expression protéique a été vérifié par western blot (Figure 43). Ils présentent tous un bon niveau d'expression en comparaison avec le niveau de GRXS17 dans Col-0. Ces lignées ont ensuite été observées au microscope confocal afin de vérifier leur niveau d'expression et de connaître l'effet des mutations sur la localisation (Figure 44). Les lignées 35S:GRXS17-C33S-GFP (2), (3) et (4) présentent une double localisation nucléaire et cytosolique. Ces lignées sont observées à des niveaux un peu plus faibles que les lignées contrôles et nucléaires (Figure 44b, c et d). La mutation de la cystéine 33 n'affecte donc pas la localisation de la protéine GRXS17. Les lignées 35S:GRXS17-C179S-GFP (1) et 35S:GRXS17-C416S-GFP (1) présentent également une double localisation avec un bon signal (Figure 44e et f). La mutation de la cystéine 179 et de la cystéine 416 n'affectent donc pas la localisation de la protéine. Enfin, pour les transformants comportant les 4 cystéines mutées, la localisation semble principalement cytoplasmique (même si le niveau de répartition cytoplasme/noyau peut varier d'une cellule à l'autre) et le signal est faible pour les 3 lignées 35S:GRXS17-C33/179/309/416S-GFP (1), (3) et (4) (Figure 44g, h et i). En effet, sur toutes les observations faites (5 à 8 racines par transformant), la protéine semble très peu localisée au noyau en comparaison avec la lignée 35S:GRXS17-GFP. Il semblerait donc que la quadruple mutation impacte fortement la localisation nucléaire, mais cette observation doit cependant être confirmée car le niveau

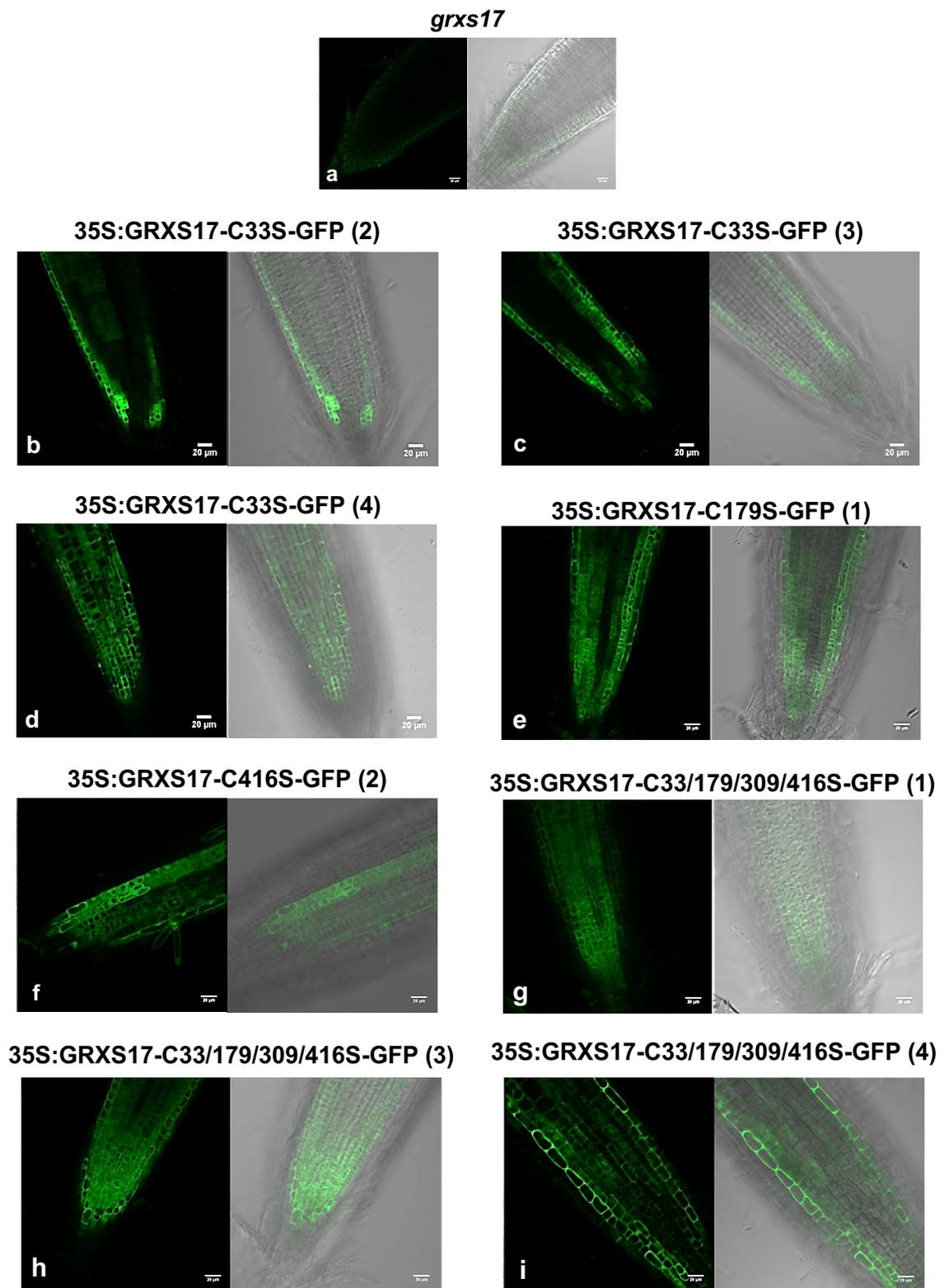


Figure 44 : Observation au microscope confocal des lignées 35S:GRXS17-C33S, 35S:GRXS17-C179S, 35S:GRXS17-C416S et 35S:GRXS17-C33/179/309/416S.

Photos représentatives de l'observation au microscope confocal de la pointe des racines primaires de plantules de 10 jours de *grxs17* et des différentes lignées complétées excitées avec un laser à 12% (a et g), 7% (b), 4% (c), 4,5% (d), 3,5% (e, f), 5% (h) et 8% (i).

de fluorescence étant plus faible, il ne faudrait pas que nous soyons en présence d'un artefact d'observation. Ces données, si elles se confirment, suggèrent soit un rôle redondant des cystéines (puisque les mutations simples des 3 cystéines 33/179/416 n'ont pas d'effet) dans la localisation nucléaire de GRXS17, soit un rôle majeur de la troisième cystéine puisque nous n'avons pas pu tester cette construction en complémententation.

Nous avons ensuite analysé la croissance de la racine primaire de ces différentes lignées complémentées à 20°C et à 28°C pour savoir si ces cystéines étaient importantes dans la fonction de la protéine (Figure 45). Les trois lignées contenant la simple mutation de la cystéine C33 ne complètent pas la croissance de la racine primaire à 20°C et à 28°C, car les longueurs moyennes sont très proches de celles de *grxs17* (Figure 45A et B). C'est également le cas pour les lignées contenant la quadruple mutation des cystéines. Les longueurs moyennes des racines primaires sont proches ou même inférieures à celles du mutant aux deux températures. Pour les lignées contenant la simple mutation de la cystéine C179 et C416 c'est différent. Pour la lignée avec la mutation en C179, à 20°C et à 28°C, la croissance de la racine primaire est complémentée de façon partielle puisque les longueurs moyennes sont significativement supérieures à celles de *grxs17*. Pour la lignée avec la mutation C416, à 20°C elle complémente presque totalement la croissance de la racine primaire car sa longueur moyenne est très significativement supérieure à celle du mutant et elle est proche de celle de Col-0 (Figure 45A). A 28°C, la complémententation est intermédiaire mais elle se rapproche de celle de Col-0 puisque à l'inverse du mutant les plantules démarrent et continuent une croissance racinaire (Figure 45B). Pour conclure, la mutation de la cystéine C33 et les quadruples mutations affectent la croissance de la racine primaire et plus généralement celle de la racine. La croissance ne démarre jamais comme c'est le cas pour le mutant. Pour les autres lignées, les complémententations sont partielles mais les racines s'engagent dans la croissance à l'inverse du mutant. Ces données suggèrent que les 3 cystéines des 3 domaines GRX ne jouent pas ou de façon mineure un rôle dans la fonction de la protéine et que la cystéine C33 du premier domaine y joue un rôle primordial puisque la simple mutation de celle-ci abolit complètement la fonction de la protéine malgré un niveau de protéine élevé dans les cellules.

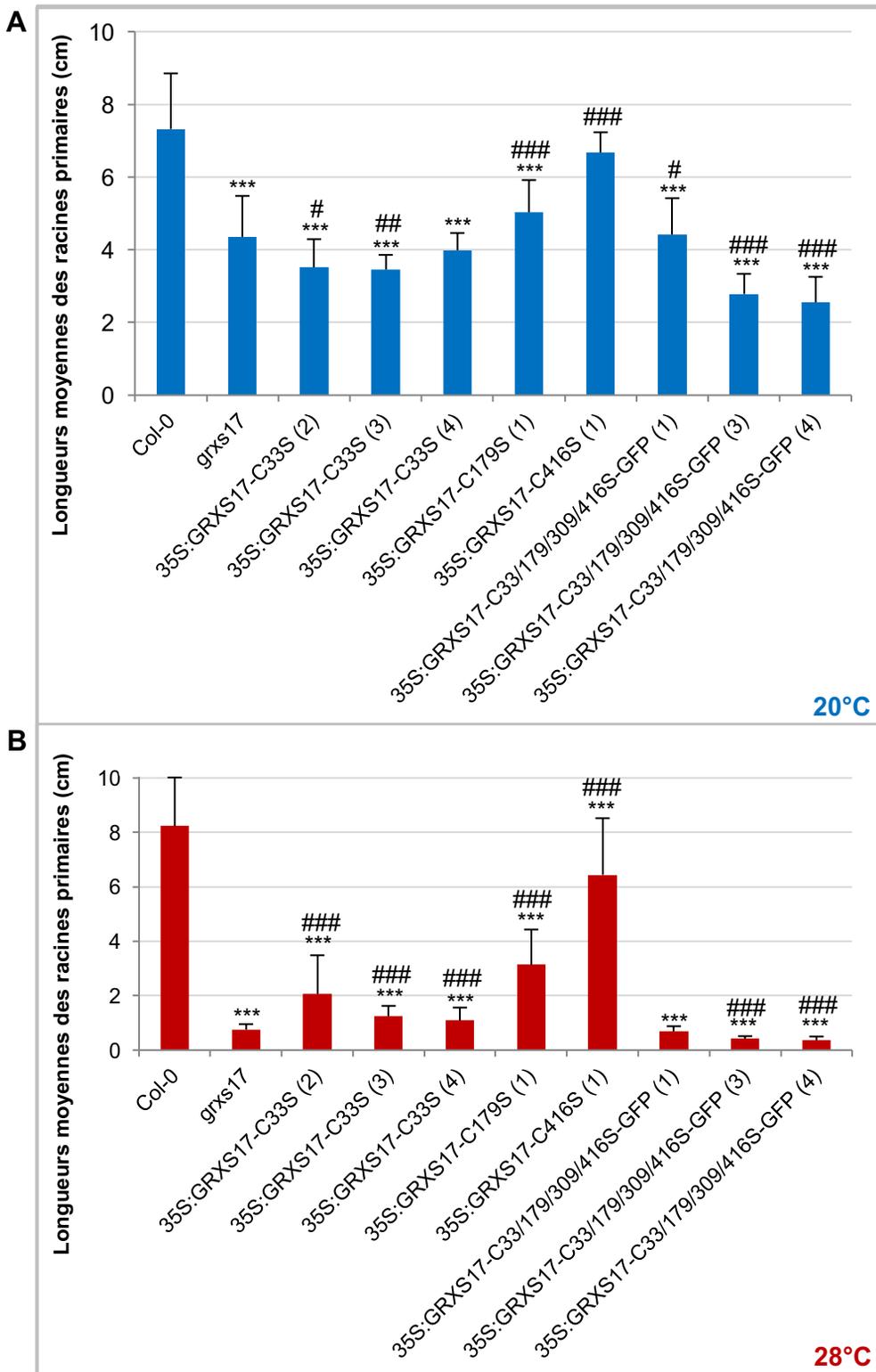
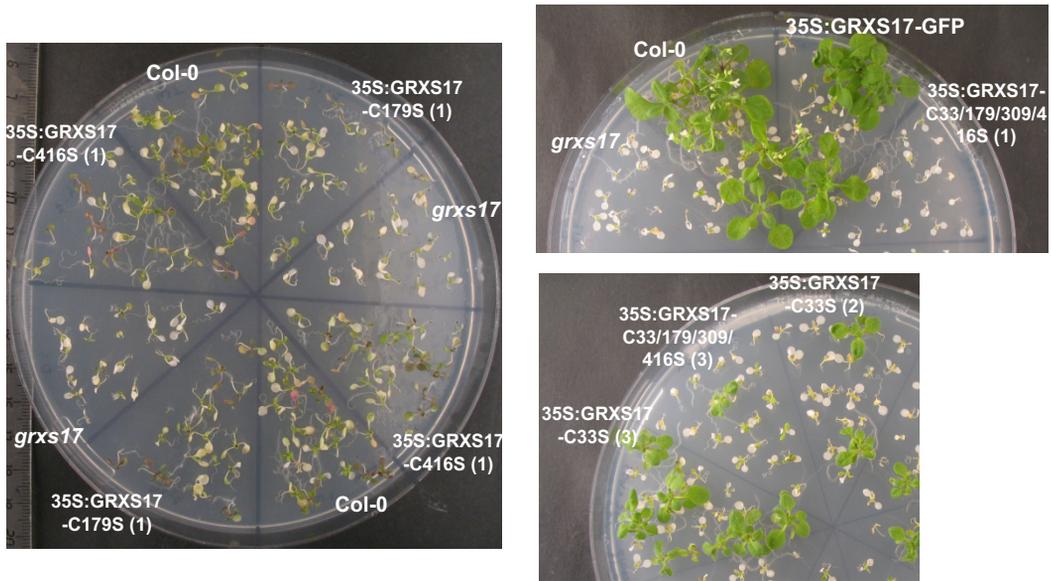


Figure 45 : Etude des longueurs des racines primaires des lignées 35S:GRXS17-C33S, 35S:GRXS17-C179S, 35S:GRXS17-C416S et 35S:GRXS17-C33/179/309/416S.

Longueurs moyennes (en cm) des racines primaires de Col-0, de *grxs17* et des lignées complémentées ayant poussé 12 jours à 20°C et à 28°C. Longueurs moyennes provenant de deux répétitions biologiques, chacune contenant un à deux réplicats techniques. Un t-test Student a été appliqué sur les données ; des p-values inférieures à 0,05 et à 0,001 sont représentées par * et *** ou # et ### pour la comparaison avec Col-0 (*) ou avec *grxs17* (#).

A



B

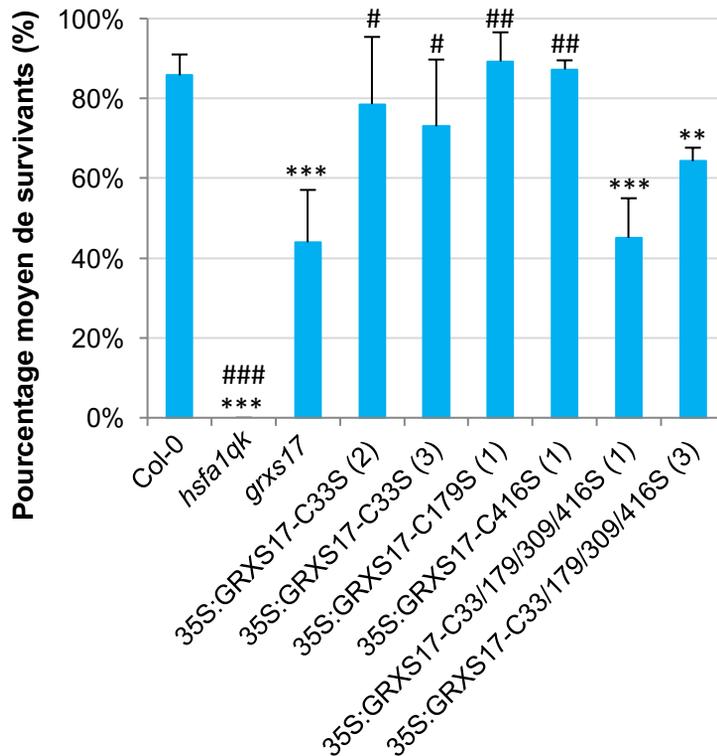


Figure 46 : Essais de thermotolérance sur 35S:GRXS17-C33S, 35S:GRXS17-C179S, 35S:GRXS17-C416S et 35S:GRXS17-C33/179/309/416S avec l'application du régime TMHT.

(A) Photos représentatives des différentes plantules ; les photos à droite ont été prises plus tard, à 17 et 15 jours après le traitement de 6 jours à 35°C. (B) Graphique des pourcentages moyens de survivants calculés après l'application du régime TMHT. Il s'agit de la moyenne de une à trois répétitions biologiques en fonction des lignées complémentées avec une moyenne totale de réplicats techniques allant de deux triangles (pour 35S:GRXS17-C179S (1) et 35S:GRXS17-C416S (1)) à huit triangles pour *grxs17*. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-value inférieures à 0,05, 0,01 et 0,001 sont représentées par *, ** et *** ou #, ##, et ### pour la comparaison avec le Col-0 (*) et *grxs17* (#).

II.2.2 Analyse du rôle des cystéines dans la thermotolérance :

Nous avons également fait pousser ces lignées sous un régime TMHT afin de comprendre le rôle des cystéines dans la thermotolérance conférée à la plante par GRXS17 (Figure 46). Les pourcentages moyens de survivants ont été calculés 8 jours après le traitement (Figure 46B). Les mutations des cystéines 179 et 416 n'impactent pas la thermotolérance puisque les pourcentages moyens de survivants pour ces lignées sont très proches de celui de Col-0. Elles ne semblent donc pas être importantes dans la fonction de thermotolérance de GRXS17. Pour la mutation de la cystéine 33 du premier domaine, les incertitudes sont assez importantes pour les deux lignées, mais les tests statistiques montrent que la différence n'est pas significative avec le sauvage, donc la cystéine 33 ne joue pas de rôle. Enfin, la mutation des quatre cystéines des sites actifs fait perdre complètement la thermotolérance. Les pourcentages de survivants pour la lignée 3 ne sont significativement pas différents de *grxs17*. Ces données suggèrent soit un rôle redondant des cystéines (puisque les mutations simples des 3 cystéines 33/179/416 n'ont pas d'effet) dans la thermotolérance, soit un rôle majeur de la troisième cystéine puisque nous n'avons pas pu tester cette construction en complémentation.

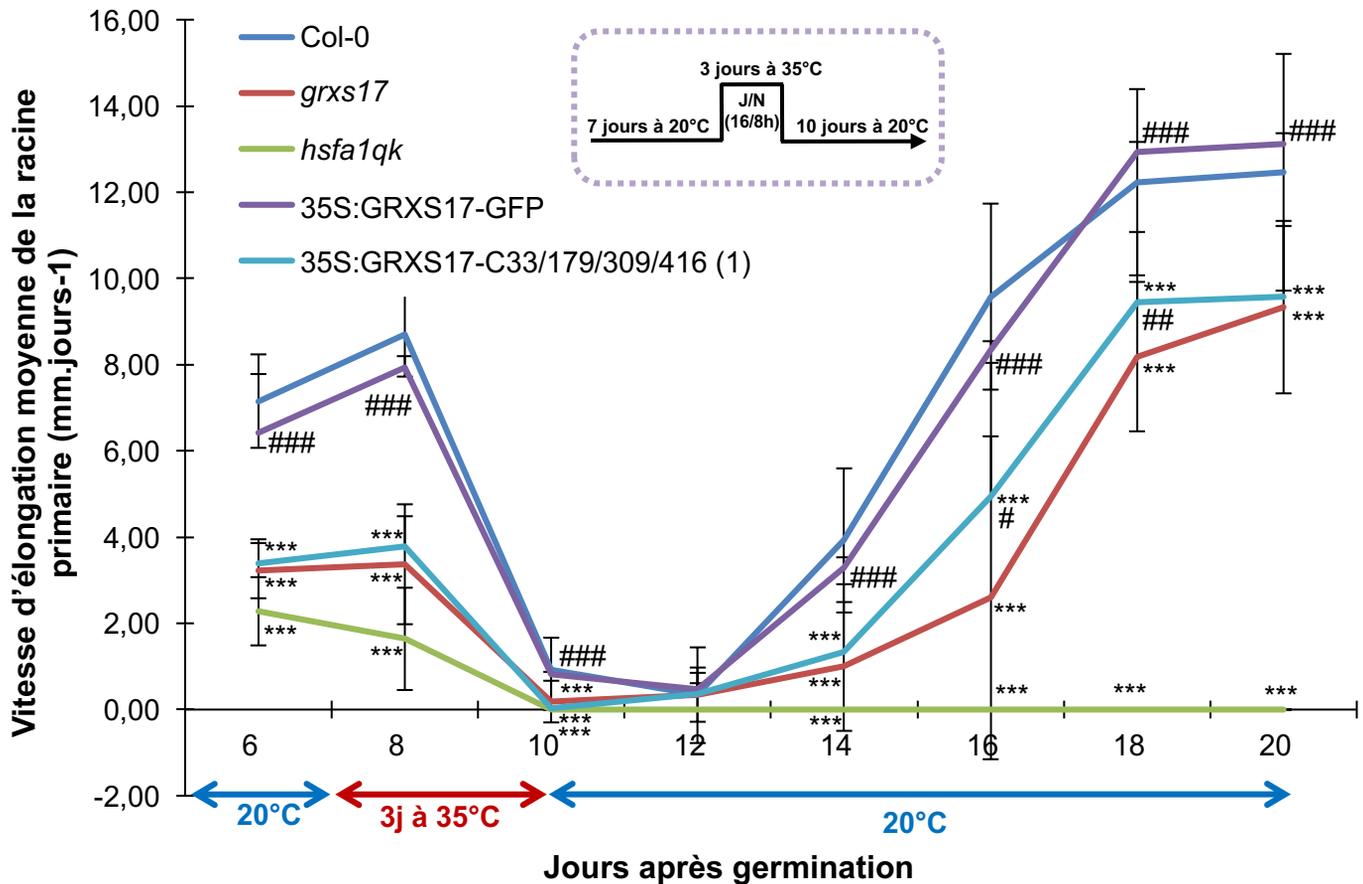


Figure 47 : Etude de la vitesse d'élongation de la racine primaire de *grxs17*, des lignées 35S:GRXS17-GFP et 35S:GRXS17-C33/179/309/416 (1) après l'application d'un stress de 3 jours à 35°C.

Les plantules ont poussé sur du ½ MS pendant 20 jours selon un régime particulier : 7 jours à 20°C, 3 jours à 35°C et 10 jours à 20°C. Les racines primaires ont été mesurées au bout du 4^{ème} jour tous les deux jours afin de calculer la vitesse d'élongation de ces racines primaires au cours de l'application du régime. En bleu, les données de vitesse d'élongation du Col-0 (26 plantules au total), en rouge bordeaux de *grxs17* (27 p.), en vert de *hsfa1qk* (25 p.), en violet de 35S:GRXS17-GFP (17 p.) et en turquoise de 35S:GRXS17-C33/179/309/416 (1) (33 p.). Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-values inférieures à 0.05, 0.01 et 0.001 sont représentées par *, ** et *** ou #, ##, et ### pour la comparaison avec le Col-0 (*) et *grxs17* (#).

II.2.3 Etude de la vitesse d'élongation de la racine primaire après l'application d'un stress thermique de 3 jours à 35°C :

Afin d'étudier la croissance de la plante notamment la croissance racinaire de *grxs17* lors de l'application d'un régime thermique de type TMHT à 35°C, les vitesses moyennes d'élongation des racines primaires de Col-0, du quadruple mutant *hsfalqk*, de *grxs17*, des lignées complémentées 35S:GRXS17-GFP et 35S:GRXS17-C33/179/309/416S-GFP (1) ont été suivies lors d'un régime thermique plus court de 3 jours à 35°C (Figure 47).

Les deux mutants présentent des vitesses d'élongation plus faibles que la souche sauvage en conditions normales de croissance (avant stress), et *hsfalqk* est plus affecté que notre mutant. Dès deux jours à de traitement à 35°C, les vitesses d'élongation de *grxs17* et de *hsfalqk* chutent à zéro. La vitesse d'élongation de Col-0 décroît également mais reste non nulle. Les deux mutants semblent donc être plus affectés par le stress thermique puisque leur vitesse d'élongation devient nulle dès deux jours de traitement. En ce qui concerne la reprise de croissance après stress, comme attendu, *hsfalqk* est très affecté par le traitement thermique et il n'y a pas de reprise de croissance, les plantules blanchissent et meurent. Le mutant *grxs17* reprend sa croissance au bout de 12 jours (deux jours après le stress) et la vitesse d'élongation s'accroît jusqu'à 20 jours mais sa reprise de croissance est ralentie si on compare avec celle de Col-0. A noter que ses vitesses d'élongation à 18 et 20 jours sont plus importantes qu'à 6 jours de croissance, mais restent inférieures à celles du sauvage. En comparaison, le contrôle Col-0 reprend sa croissance après le 12^{ème} jour de croissance avec une vitesse d'élongation à 20 jours presque 3 fois plus élevée qu'à 6 jours de croissance. L'ensemble de ces données confirment la différence de croissance de *grxs17* par rapport au contrôle, sa vitesse d'élongation avant et après le stress reste inférieure. Cependant, cet écart semble être diminué après l'application du traitement thermique puisqu'à 6 jours, il est d'un facteur 1/2 et à 20 jours d'1/4. La croissance de la racine primaire de *grxs17* reprend après ce stress de 3 jours à 35°C à l'inverse de *hsfalqk*. GRXS17 est donc nécessaire à une croissance racinaire optimale et joue également un rôle dans la reprise de la croissance après ce stress de 3 jours à 35°C, puisque celle-ci est plus lente.

La vitesse d'élongation de la racine primaire de la lignée 35S:GRXS17-GFP après l'application d'un stress de 3 jours à 35°C a également été suivie (Figure 47). Les vitesses moyennes d'élongation des racines primaires de cette lignée sont semblables à celles de Col-0. La lignée complémentée se comporte donc comme le sauvage. Ces données confirment que c'est bien la délétion de *GRXS17* qui

impacte la croissance de la racine puisque les vitesses d'élongation durant les 20 jours sont identiques à celles de Col-0.

Pour résumer, les résultats des paragraphes précédents nous montrent que la mutation des quatre cystéines des sites actifs impacte la localisation subcellulaire, la croissance de la racine primaire à 20°C mais aussi à 28°C, et semble jouer un rôle important dans la résistance à des régimes thermiques longs de type TMHT. Pour compléter ces résultats, nous avons mesuré les vitesses moyennes d'élongation de la racine primaire de la lignée 35S:GRXS17-C33/179/309/416S (1) après un traitement thermique de 3 jours à 35°C (Figure 47). Les vitesses moyennes d'élongation de cette lignée sont proches de celles du mutant *grxs17*, à l'inverse de la lignée 35S:GRXS17-GFP (4) qui a une croissance similaire au Col-0. A 10 jours de croissance, après 3 jours de traitement à 35°C, la croissance de la racine primaire est arrêtée. Elle reprend à 12 jours pour atteindre une vitesse d'élongation identique à celle du mutant à 20 jours. Cependant, à la différence de *grxs17*, la reprise de la croissance n'est pas ralentie. La pente de la vitesse d'élongation du 14^{ème} au 18^{ème} jour se rapproche de celle de Col-0 et de la lignée 35S:GRXS17-GFP. L'ensemble de ces données confirment que la protéine contenant les mutations des quatre cystéines ne complémente pas la croissance de la racine primaire à 20°C mais également lors d'un traitement thermique de 3 jours à 35°C. La présence de ces quatre cystéines est nécessaire à l'accomplissement de la fonction de GRXS17 dans la croissance des racines primaires à 20°C et lors de l'application d'un stress thermique de 3 jours à 35°C. Concernant chaque cystéine, il apparaît que soit les 4 cystéines sont redondantes dans leur rôle, soit la troisième cystéine joue un rôle majeur dans la localisation nucléaire et la résistance au stress de type TMHT, mais nous ne pouvons pas écarter ces deux hypothèses car la construction 35S:GRXS17-C309S manquent pour cette analyse. En revanche, il est très clair que la première cystéine du domaine TRX joue un rôle majeur dans la croissance à 20°C et 28°C sans mécanisme de redondance avec les autres, puisque la lignée complétementée se comporte comme la lignée mutante.

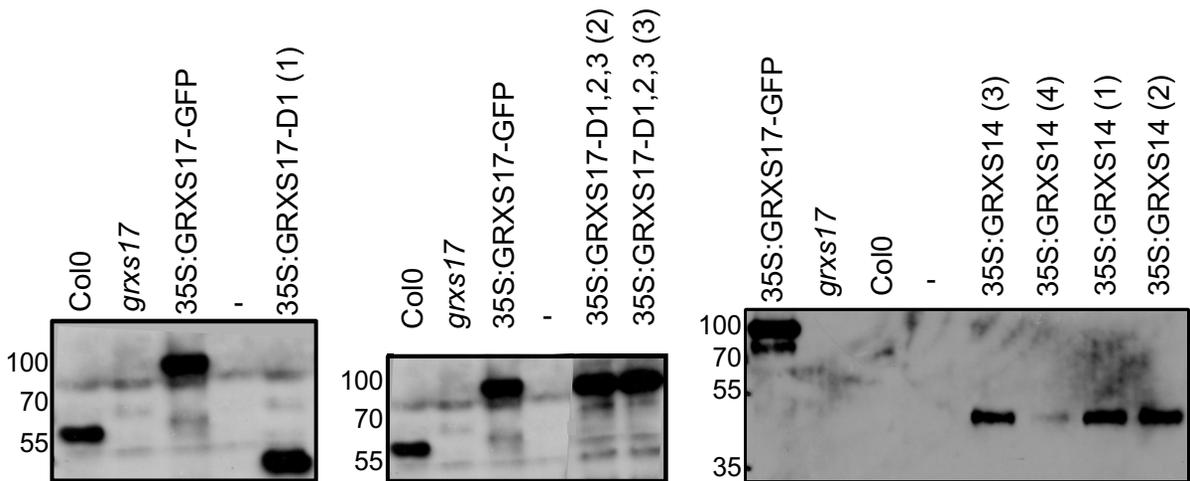
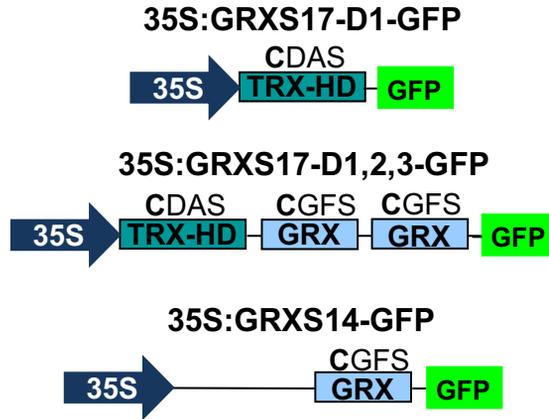


Figure 48 : Etude du rôle des domaines avec les lignées 35S:GRXS17-D1, 35S:GRXS17-D1,2,3 et 35S:GRXS14.

Western blot à partir d'extraits protéiques (10µg) des différentes plantules ayant poussé à 20°C durant 14 jours. Les protéines ont été détectées avec l'anticorps anti-GRXS17 ou l'anticorps monoclonal anti-GFP pour détecter 35S:GRXS14-GFP.

II.3 Utilisation de lignées complémentées pour déterminer le rôle des différents domaines de GRXS17 :

II.3.1 Etude du rôle des domaines de GRXS17 dans la croissance racinaire :

GRXS17 a la particularité de posséder 4 domaines, un domaine de type thiorédoxine et trois autres domaines de type glutarédoxine. Sa taille est d'abord inhabituelle puisque les GRX de sa classe et même de sa famille sont plus petites et possèdent un à deux domaines. Il est également rare de trouver une GRX avec un domaine de type TRX. Nous pouvons donc supposer que cette particularité confère à GRXS17 une fonction spécifique. Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons entrepris de réaliser plusieurs versions de la protéine GRXS17 privée de certains de ces domaines et de les introgresser dans *grxs17* (Figure 37). Nous avons pu étudier certaines d'entre elles comme cela est présenté dans la figure 48. Il s'agit de la lignée 35S:GRXS17-D1-GFP (1) contenant le domaine TRX seul et les deux transformants (2) et (3) de la lignée 35S:GRXS17-D1,2,3-GFP contenant les trois premiers domaines de GRXS17 (TRX et les deux domaines GRX). Afin de compléter nos analyses notamment sur le rôle du domaine GRX, nous avons introgressé le domaine GRX de la protéine GRXS14 appartenant à la même classe que GRXS17 et ceci sans son peptide d'adressage au chloroplaste pour que la protéine se localise dans le cytoplasme. GRXS14 a la particularité d'avoir un domaine GRX très proche du domaine 2 de GRXS17 (Figure 26).

Dans un premier temps, le niveau d'expression des protéines de ces lignées a été vérifié par western blot et comparé au niveau d'expression de la protéine dans Col-0 et celui de la lignée contrôle 35S:GRXS17 (4) (Figure 48). Les lignées complémentées 35S :GRXS17-D1-GFP (1), 35S:GRXS17-D1,2,3-GFP (3) et 35S:GRXS17-D1,2,3-GFP (4) présentent un niveau d'expression supérieur à Col-0 et identique à la lignée contrôle. Les protéines des 4 transformants de la lignée 35S:GRXS14-GFP (1, 2, 3 et 4) ont été détectées par western blot avec l'anticorps monoclonal anti-GFP à la différence des protéines des autres lignées complémentées où nous avons utilisé l'anticorps anti-GRXS17. A noter que les autres lignées complémentées ont également été détectées avec l'anticorps anti-GFP en parallèle dans les mêmes conditions et présentent des niveaux d'expression identiques (données non montrées). Les lignées 35S:GRXS14-GFP (1), (2) et (3) présentent un niveau d'expression légèrement inférieur à la lignée contrôle 35S:GRXS17-GFP (4). La lignée 35S:GRXS14-GFP (4) a un niveau d'expression faible. Nos données d'observation au confocal nous permettent de voir que l'ensemble de ces lignées produisent une protéine localisée dans le noyau et dans le cytoplasme (Figure 49). C'est notamment le cas pour les 2 transformants 35S:GRXS14-

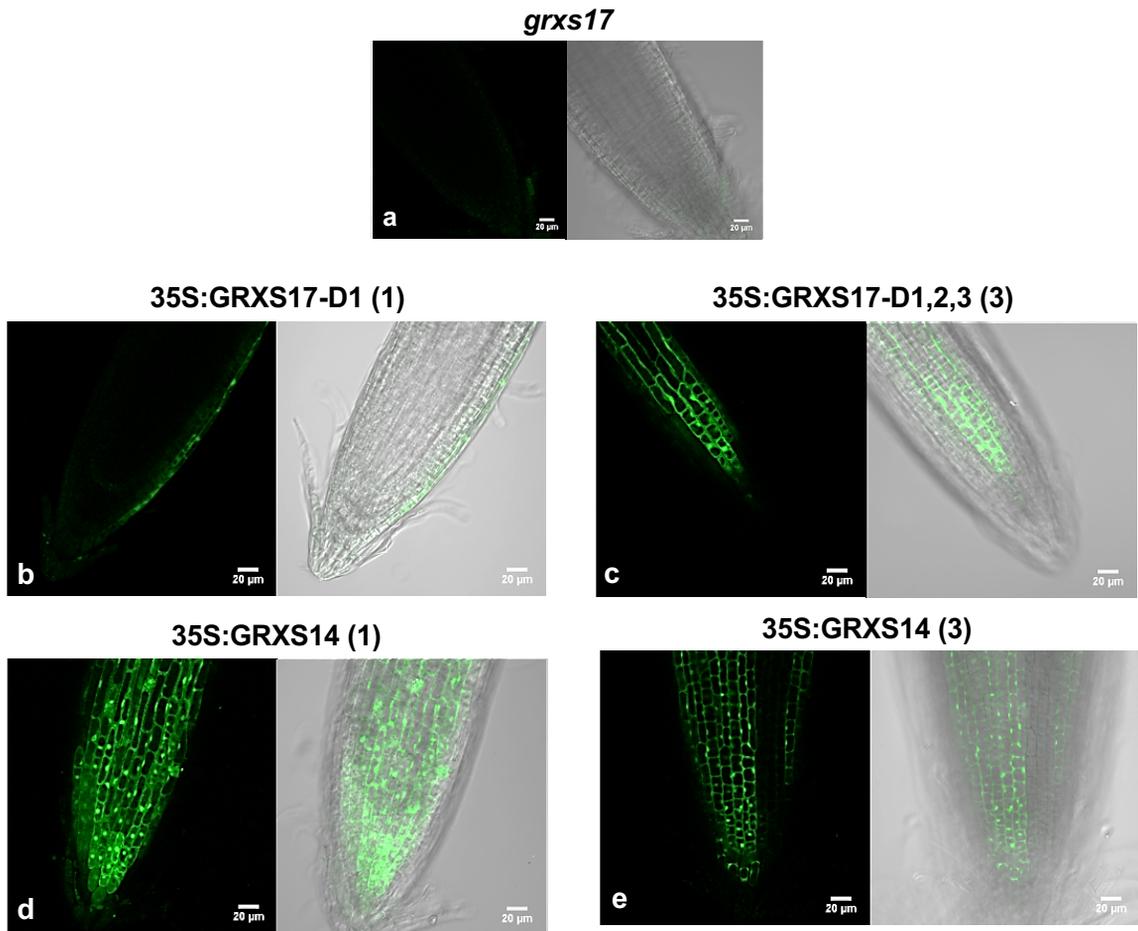


Figure 49 : Observation au microscope confocal des lignées 35S:GRXS17-D1, 35S:GRXS17-D1,2,3 et 35S:GRXS14.

Photos représentatives de l'observation au microscope confocal de la pointe des racines primaires de plantules de 10 jours de *grxs17* et des lignées excitées avec un laser à 7% (**a et b**) 4% (**c et e**), et 6% (**d**).

GFP (1) et (3) qui ont été observés avec un signal correct mais plus faible que celui de 35S:GRXS17-GFP (4). Les lignées 35S:GRXS17-D1-GFP (1) et 35S:GRXS17-D1,2,3-GFP (3) ont été observées avec un signal correct également.

Pour conclure, il semble que l'absence du dernier domaine ne modifie pas la distribution subcellulaire de la protéine (cytosol et noyau) et même que l'unique premier domaine, c'est à dire le domaine TRX suffise pour obtenir cette double localisation. Le résultat pour GRXS14 est plus surprenant, puisqu'un unique domaine GRX (sans de son peptide d'adressage chloroplastique), se comporte également comme la protéine entière avec une double localisation. A ce niveau, nous pouvons émettre deux hypothèses, soit les domaines simples fusionnés à la GFP, sont trop petit et diffusent librement au travers des pores de la membrane nucléaire (taille \approx 50-60 Kda) mais nous sommes à la limite communément reconnues, soit un seul domaine qu'il soit de type TRX ou GRX suffit pour permettre l'importation de la protéine.

Nous avons ensuite mesuré les longueurs moyennes des racines primaires de ces lignées complémentées sur des plantules qui ont poussé à 20°C et à 28°C (Figure 50). La lignée 35S:GRXS17-D1-GFP (1) a une longueur moyenne de la racine primaire intermédiaire à celle de Col-0 et de *grxs17* à 20°C. A l'inverse, à 28°C elle est similaire à celle de *grxs17*. Le domaine TRX seul permet une complémentation partielle à 20°C mais est sans aucun effet à 28°C sur la croissance de la racine primaire. Pour 35S:GRXS17-D1,2,3-GFP (2), la longueur moyenne est intermédiaire à celle de Col-0 et *grxs17* à 20°C et à 28°C. Les 3 premiers domaines seuls permettent donc une complémentation partielle de la fonction de GRXS17. La présence des 4 domaines semblent donc nécessaires pour une croissance racinaire optimale à ces deux températures, mais un seul domaine TRX permet un début de complémentation à 20°C et les 3 premiers domaines autorisent là aussi une complémentation partielle à 20°C et 28°C. Enfin, deux transformants de la lignée 35S:GRXS14-GFP ont été testés, il s'agit de 35S:GRXS14-GFP (1) et (3) et seul la lignée 1 complémente comme nous pouvons le voir sur la Figure 50. Les plantules de la lignée 35S:GRXS14-GFP (1) ont des longueurs moyennes proches de Col-0 à 20°C et intermédiaire à Col-0 et *grxs17* à 28°C. Un seul domaine GRX de GRXS14 (proche en séquence du domaine 2 de GRXS17) suffirait donc à complémente cette fonction totalement au moins à 20°C et partiellement à 28°C.

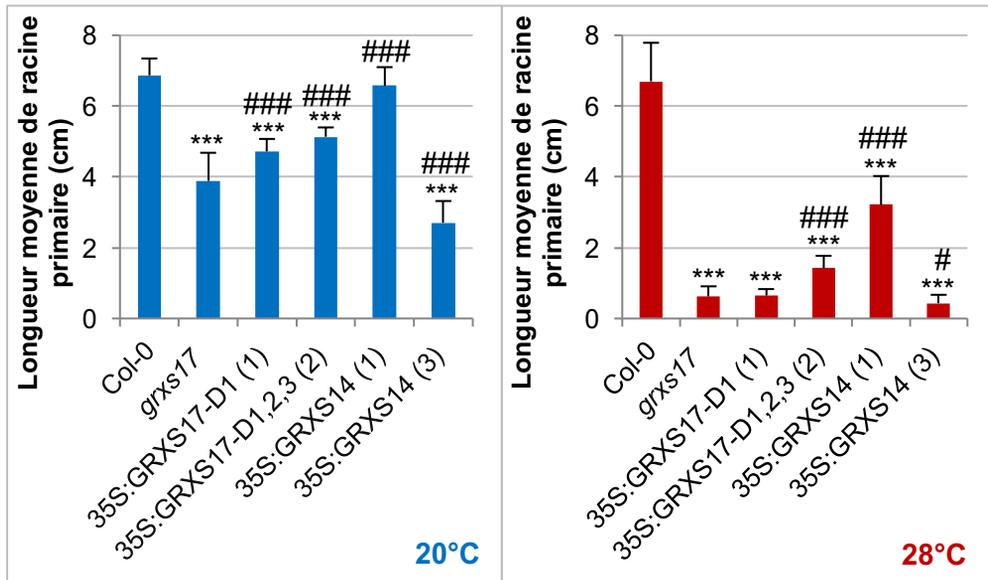


Figure 50 : Etude des longueurs de la racine primaire des lignées 35S:GRXS17-D1, 35S:GRXS17-D1,2,3 et 35S:GRXS14.

Longueurs moyennes (en cm) de la racine primaire de Col-0, de *grxs17* et des lignées complémentées ayant poussé 12 jours à 20°C et à 28°C. Longueurs moyennes d'une ou deux (pour 35S:GRXS17-D1 (1)) répétitions biologiques chacune contenant un à deux réplicats techniques. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-value inférieures à 0,05 et à 0,001 sont représentées par * et *** ou # et ### pour la comparaison avec Col-0 (*) ou avec *grxs17* (#).

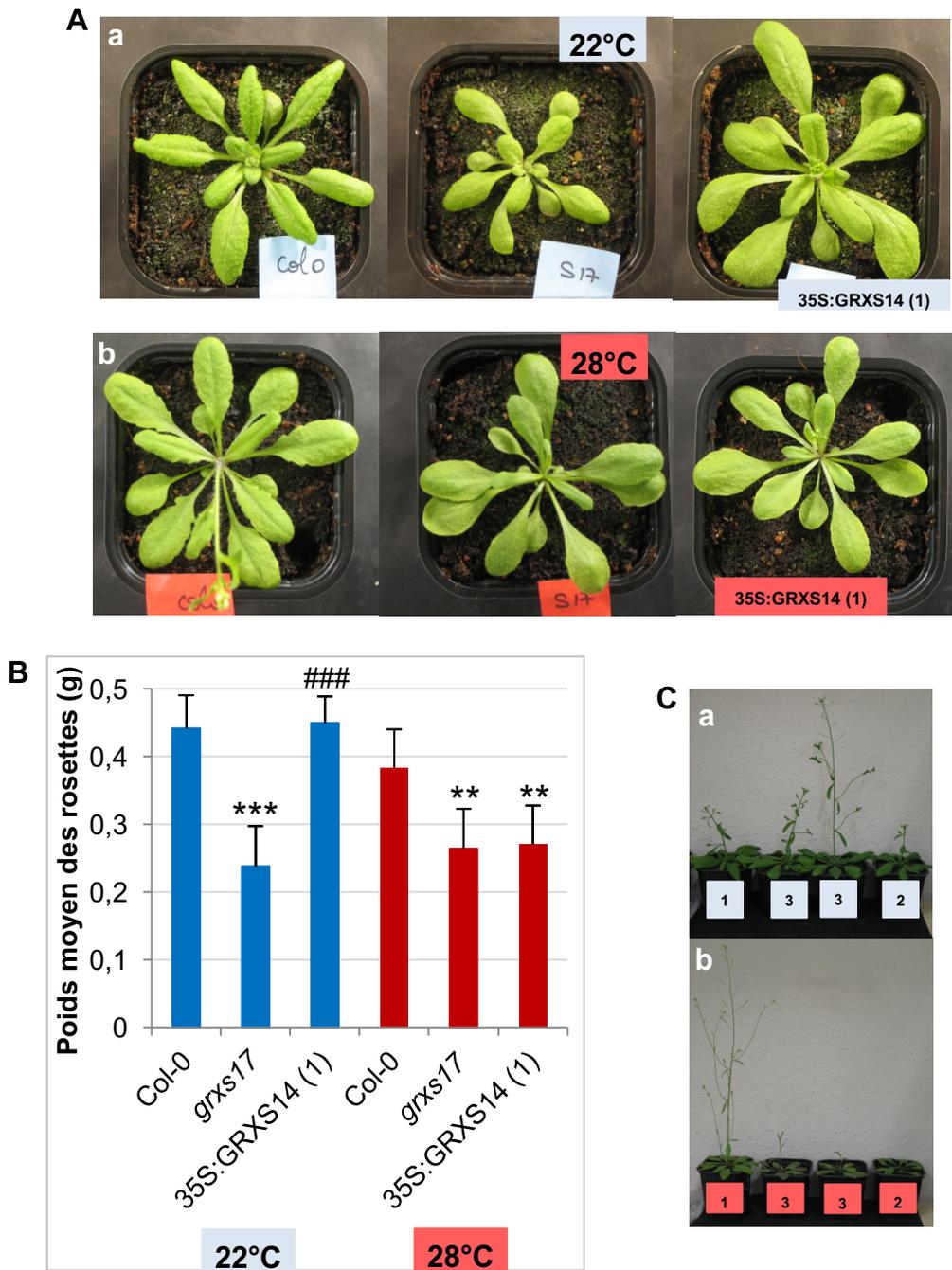


Figure 51 : Etude de la croissance foliaire et de la floraison de la lignée complétée 35S:GRXS14 (1).

(A) Photos représentatives de la croissance foliaire à 3 semaines de Col-0, de *grxs17* et de 35S:GRXS14 (1) à 22°C (a) et à 28°C (b). (B) Poids moyen des rosettes en gramme (g) à 3 semaines. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-values inférieures à 0,01 et à 0,001 sont représentées par ** et *** ou ## et ### pour la comparaison avec Col-0 (*) ou la comparaison avec *grxs17* (#). (C) Etude de la floraison de la lignée 35S:GRXS14 (1) au bout de 4 semaines de croissance à 22°C (a) et à 28°C (b). 1: Col-0, 2: *grxs17* et 3: 35S:GRXS14 (1). Il n'y a pas de répétitions biologiques pour cette lignée (comme précédemment). Les résultats sont basés sur une seule expérience contenant 8 plantes pour chaque condition.

II.3.2 Analyse de la fonction de l'unique domaine GRX de GRXS14 dans la croissance foliaire et la floraison à 22°C et à 28°C :

Nous avons décidé de compléter nos analyses de croissance de la lignée 35S:GRXS14-GFP (1) par des analyses de la croissance foliaire (Figure 51). Pour cela, les plantes de cette lignée ont poussé selon les mêmes conditions que présentées précédemment. A 22°C, la taille des rosettes semble supérieure à celle de Col-0. Les feuilles semblent globalement plus grandes que celles de ce dernier (Figure 51Aa). Les données de poids moyen des rosettes à 20°C vont dans le même sens puisque 35S:GRXS14-GFP (1) a un poids moyen des rosettes similaire à celui de Col-0 (Figure 51B). La lignée 35S:GRXS14-GFP (1) complémente la fonction de GRXS17 dans la croissance foliaire à 22°C. Un seul domaine GRX semble donc suffisant pour l'accomplissement de cette fonction. A 28°C, la taille de la rosette semble inférieure à celle du mutant (Figure 51Ab). Ceci est confirmé par le poids de la rosette de 35S:GRXS14-GFP (1) qui est similaire à celui de *grxs17* (Figure 51B). Cette lignée ne complémente pas la fonction de GRXS17 dans la croissance foliaire à 28°C. Au niveau de la floraison, à 22°C, la lignée 35S:GRXS14-GFP (1) complémente puisque la floraison de cette dernière démarre en même temps que celle de Col-0 ou bien légèrement en avance sur celui-ci (Figure 51Ca). Les hampes primaires et secondaires se développent normalement comme Col-0 et des siliques contenant des graines sont produites. A 28°C, c'est l'inverse, la floraison est tardive et la hampe florale primaire est défectueuse comme le mutant (Figure 51Cb). C'est également le cas des hampes secondaires, les fleurs sont très endommagées, des phénotypes PIN apparaissent, les siliques formées sont petites, déformées et dépourvues de graines. Pour conclure, l'unique domaine de GRXS14 complémente la croissance de la rosette, la floraison et la mise à fleurs à 22°C mais ce n'est pas du tout le cas à 28°C. Ces données suggèrent qu'un seul domaine GRX semble suffisant pour complémente la fonction de GRXS17 dans la croissance foliaire, la floraison et la mise à fleurs à 22°C mais pas lors de températures plus élevées où la présence de la protéine GRXS17 semble nécessaire.

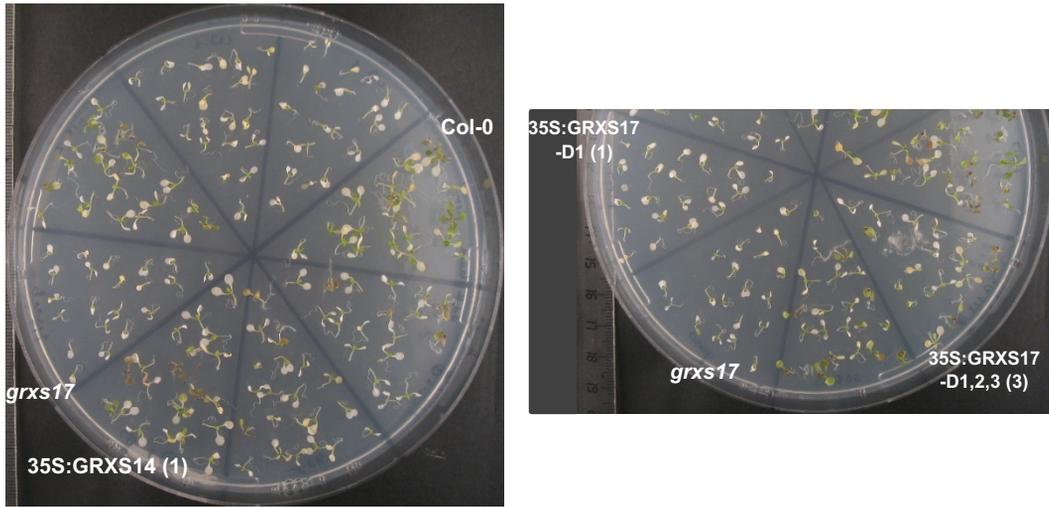
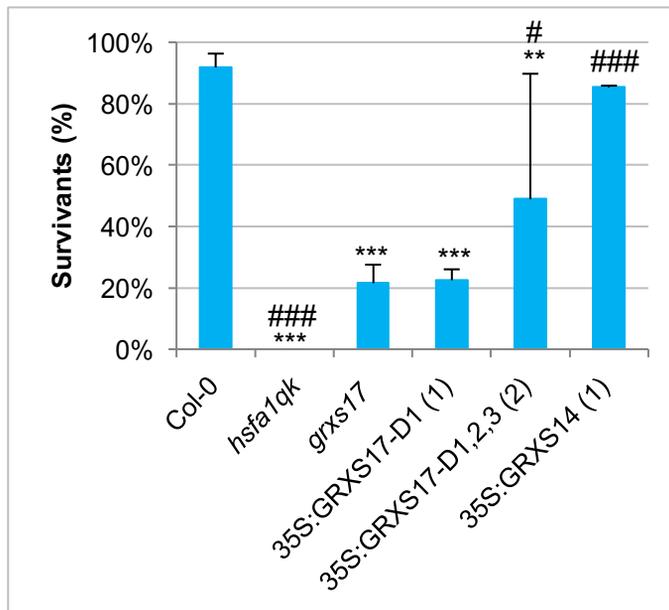
A**B**

Figure 52 : Essais de thermotolérance sur 35S:GRXS17-D1, 35S:GRXS17-D1,2,3 et 35S:GRXS14 : application du régime TMHT.

Photos représentatives des plantules (A) et graphe des pourcentages moyens de survivants calculés après l'application du régime TMHT (B). Moyenne de deux réplicats techniques allant de deux triangles pour les lignées complémentées à dix triangles pour Col-0 et *grxs17*. Un t-test de Student a été appliqué sur les données ; des p-value inférieures à 0,05, 0,01 et à 0,001 sont représentées par *, ** et *** ou #, ## et ### pour la comparaison avec le Col-0 (*) et le *grxs17* (#).

II.3.3 Rôle des domaines de GRXS17 dans la thermotolérance :

Des essais de thermotolérance ont été réalisés sur ces lignées complémentées et sont présentés dans la figure 52. Le pourcentage moyen de survivants pour la lignée 35S:GRXS17-D1-GFP (1) est identique à celui de *grxs17* (Figure 52). Le domaine TRX seul ne complète pas la fonction de thermotolérance de GRXS17. Les pourcentages de survivants de 35S:GRXS17-D1,2,3-GFP (3) des deux répétitions sont très différents, ils sont de 78% et de 20%, en l'état, il est donc très difficile d'interpréter les résultats. La lignée 35S:GRXS14-GFP (1) présente un pourcentage moyen de survivants très proche de celui de Col-0. Le seul domaine GRX de GRXS14 complète donc la fonction de thermotolérance GRXS17.

Pour conclure, sur le rôle des différents domaines. Il apparaît que le premier domaine (TRX) semble suffisant pour une double localisation, partiellement efficace pour la croissance à 20°C, et inefficace pour la croissance à 28°C et pour la résistance au stress thermique de type TMHT. Le quatrième domaine ne semble pas important pour la double localisation, mais joue un rôle pour la croissance à 20° et 28°C. Enfin, plus surprenant, un seul domaine GRX, celui de GRXS14 permet une double localisation, une bonne complémentation pour la TMHT et la croissance à 20°C, et seulement une complémentation partielle pour la croissance à 20°C et 28°C.

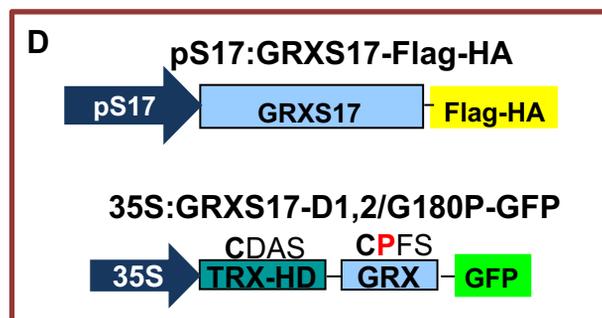
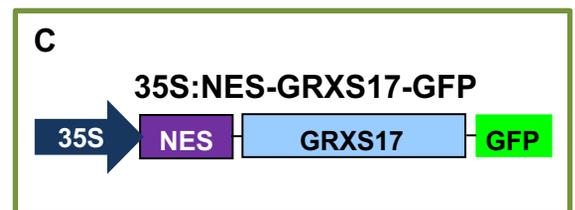
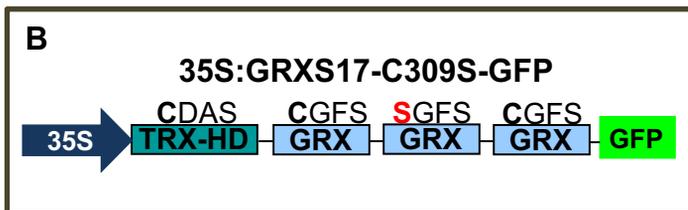
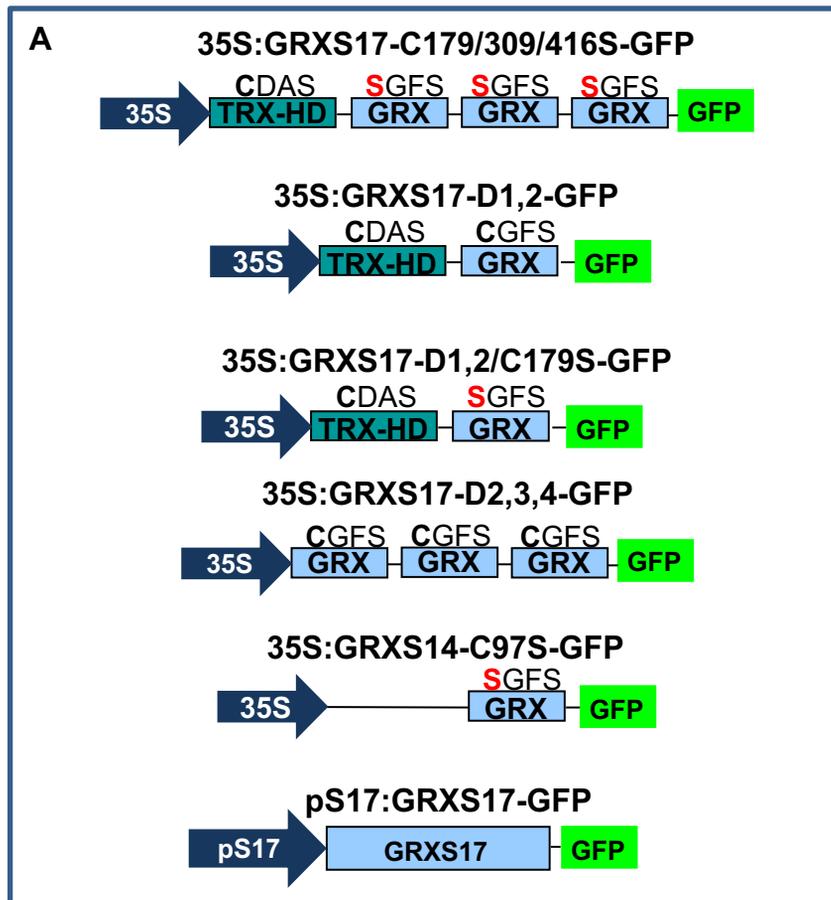


Figure 53 : Etude des autres lignées complémentées.

Les autres lignées complémentées étudiées qui n'ont pas été utilisées pour différentes raisons. **(A)** Pour des niveaux de protéines très faibles ou inexistant. **(B)** La transformation n'a pas abouti, un nouvel essai a été fait mais les nouveaux transformants sont encore hétérozygotes. **(C)** Les protéines de cette lignée complémentée se localisent dans le cytoplasme et dans le noyau ; **(D)** Elles n'ont pas encore été étudiées.

II.4 Présentation des autres lignées complémentées utilisées :

Cette dernière partie regroupe les lignées complémentées qui n'ont pas été utilisées pour différentes raisons (Figure 53). Certaines ont un niveau de protéines très faible ou inexistant en western blot (western non montrés) (Figure 53A). Les observations au confocal le confirment avec un signal faible voir très faible et les mesures de la racine primaire à 20°C et à 28°C sont proches de celles du mutant *grxs17* (données non montrées). Pour la lignée 35S:GRXS17-C309S-GFP, la transformation n'avait pas aboutie puisque tous les transformant étaient sensibles à l'hygromycine (Figure 53B) (données non montrées). La transformation a été faite à nouveau, les cinq transformants obtenus sont encore tous hétérozygotes. Enfin, deux dernières lignées complémentées n'ont pas pu être exploitées lors de cette étude par manque de temps, il s'agit de pS17:GRXS17-Flag-HA et de 35S:GRXS17-D1,2/G180P-GFP (Figure 53D).

DISCUSSION

I. GRXS17 est importante dans la croissance à des températures normales et plus élevées et confère la thermotolérance à la plante :

Les données de la caractérisation du mutant KO *grxs17* confirment qu'il est affecté au niveau de la croissance de la racine primaire à 20°C et de manière plus aggravée à 28°C (Figure 31). La croissance foliaire à 22°C et à 28°C est également impactée chez *grxs17* (Figures 33 et 34). La floraison de ce dernier est normale à 22°C mais elle est défaillante à 28°C où certaines plantules présentent des hampes florales primaires et secondaires de type PIN (Gälweiler et al., 1998). Enfin, la zone méristématique du mutant est plus petite que celle du contrôle ce qui montre une défaillance dans le MAR et peut expliquer le retard de croissance chez le mutant (Figure 32). La zone d'élongation est, à l'inverse, plus grande chez le *grxs17*, ceci pouvant être une compensation pour pallier une zone méristématique plus petite. *grxs17* présente un index mitotique moyen deux fois plus petit que le Col-0 qui est restauré par l'ajout de GRXS17. Ceci suggère que le défaut de croissance de celui-ci provient d'une diminution de l'activité mitotique de la zone méristématique. A 28°C, de la mort cellulaire au niveau du MAR est observé, ce qui peut expliquer le sévère défaut de croissance de la racine primaire. GRXS17 semble donc jouer un rôle important au niveau du méristème racinaire dans la division cellulaire à 20°C et l'adaptation de ce groupe de cellule à des températures plus élevées (28°C). Il semble que ce soit également le cas dans le méristème apical.

Les études sur GRXS17 ont été menées à plusieurs températures notamment à 28°C et 35°C. Dans nos conditions de culture, *GRXS17* n'est pas sur-accumulé en réponse à l'augmentation de la température dans des plantules de 14 jours (Figure 29) (Cheng et al., 2011a). Les niveaux relatifs de la protéine GRXS17 semblent plus ou moins constants, ce qui montre une absence de régulation traductionnelle et post-traductionnelle dans les conditions testées.

Le mutant *grxs17* est sensible à un stress long de 6 jours à 35°C (Figure 35). L'introgression de GRXS17 dans le mutant restaure la survie des plantules, ce qui montre que GRXS17 est impliquée lors de stress longs à température modérément élevée de type TMHT (Figure 42). GRXS17 confère donc à la plante la thermotolérance dans ce type de stress. Les pourcentages de survie de *grxs17* lors des régimes de thermotolérance acquise LAT et SAT sont proches de Col-0, ce qui montre que GRXS17 est spécialement impliquée dans des stress longs à température modérément élevée (Figure

35). Plusieurs acteurs sont liés à la réponse au stress thermique comme les vagues calciques, les MAPK, HSF, les HSP, les ROS, les enzymes anti-oxydantes et les hormones (Mittler et al., 2012; Jacob et al., 2017). Lors d'un régime de type TMHT, les HSF sont importantes. En effet, aucune plantule du quadruple mutant *hsf1qk* ne survient sous ce régime (Figure 35) (Liu and Charng, 2013). Ces auteurs ont montré qu'HSFA2 introgressée dans ce quadruple mutant était capable de restaurer la survie de ce dernier. Les HSP protègent les protéines dépliées de l'agrégation et les enzymes anti-oxydantes contrôlent le niveau de ROS intracellulaire (Mittler et al., 2012; Jacob et al., 2017). GRXS17 semble jouer un rôle important en plus de ces acteurs (discuté dans le chapitre 2 et la discussion générale).

II. La localisation nucléaire semble nécessaire à la thermotolérance conférée par GRXS17 :

La localisation seule de GRXS17 dans le noyau ne complémente pas totalement la croissance de la plante, la floraison et la mise à fleurs à 20°C, 22°C et notamment à 28°C, ce qui montre que soit une double localisation est nécessaire à l'accomplissement de sa fonction (Figures 40 et 41), soit le niveau de protéine nucléaire dans les tissus spécifiques n'est pas atteint, d'où une complémentation partielle. Par contre, la localisation dans le noyau suffit à conférer la thermotolérance à la plante (Figure 42). Cet élément est très intéressant puisque le berceau de la réponse au stress thermique est nucléaire. La relocalisation du cytoplasme vers le noyau des HSF lors du stress thermique leur permet d'induire des gènes de réponse au stress thermique (Barros et al., 1992; Jacob et al., 2017). La protéine AtGRXS17 surexprimée dans la tomate est relocalisée dans le noyau lors d'un stress thermique et d'un stress au froid (Wu et al., 2012; Hu et al., 2015). Ceci a pu être testé avec la lignée complémentée 35S:GRXS17-GFP au microscope confocal lors d'une cinétique de stress thermique à 28°C et 35°C (similaire à la cinétique de la figure 29), cependant aucune relocalisation claire n'a été observée (données non montrées). L'expression de GRXS17 sous promoteur 35S peut expliquer l'absence de relocalisation puisqu'elle est très fortement exprimée dans les deux compartiments (Figure 38). Il serait donc intéressant de renouveler ces essais avec la lignée pS17:GRXS17-GFP lorsqu'elle sera disponible et d'analyser à nouveau la localisation dans les deux compartiments. GRXS17 pourrait par exemple participer à l'induction de gènes importants pour la thermotolérance, agir sur/ou avec des acteurs de la résistance au stress thermique telles que les HSF ou les HSP ou peut-être même dans la voie de contrôle du stress oxydatif.

III. Les cystéines des sites actifs sont importantes dans la croissance de la plante et dans la thermotolérance :

La mutation de la cystéine C33 et la quadruple mutation affectent la croissance de la racine primaire et plus généralement celle de la racine totale aux deux températures (Figure 45). A 28°C, la croissance des deux lignées ne démarre jamais comme pour le mutant. Pour les autres lignées, les complémentations sont partielles à 20°C et à 28°C mais à 28°C les racines s'engagent dans le processus de croissance contrairement au mutant. La cystéine C179 a un faible impact puisque la complémentation est partielle. Quant à la cystéine C416, son rôle est mineur dans cette fonction puisque nous observons une complémentation aux deux températures. Ces données suggèrent que la cystéine 33 est primordiale pour la fonction de la protéine pour la croissance à 20°C et 28°C et que celles des domaines GRX, le sont beaucoup moins. Par contre, la cystéine 33 du domaine TRX ne semble pas être essentielle dans la thermotolérance puisque les lignées contenant la mutation C33S complètent de façon partielle avec une différence significative par rapport à *grxs17* (Figure 46). La cystéine C33 aurait donc un rôle spécifique dans la protéine pour le développement racinaire et certainement apical à 20°C et à 28°C, mais pas dans le processus de thermotolérance. Concernant les 3 autres cystéines la seconde et quatrième ne semblent pas jouer un rôle important dans la croissance racinaire, mais concernant la troisième l'absence de la construction mutée sur cette dernière ne nous permet pas de conclure. Pour la thermotolérance, les cystéines C33, C179 et C416 ne jouent visiblement pas de rôle. Pour conclure sur la perte de la thermotolérance par la lignée contenant les quatre mutations de cystéines, il nous manque les résultats sur le mutant sur la troisième (C309). Soit la cystéine C309 est à un rôle majeur dans la fonction, soit les cystéines sont redondantes, c'est à dire que la présence d'au moins une d'entre elles suffit à la fonction de la protéine.

Les cystéines sont connues comme ayant un rôle majeur dans la fonction des GRX en général (Meyer et al., 2012). Les cystéines réduites peuvent subir plusieurs types d'oxydation comme la glutathionylation ou la formation de ponts disulfures (Figure 16) (Martins et al., 2018). Les GRX sont capables de réduire ces cystéines oxydées avec l'aide de GSH. Nous pourrions donc penser que GRXS17 pourrait agir en tant que réducteur des cystéines oxydées sur des protéines impliquées dans la croissance des racines. La seule évidence à ce jour que GRXS17 possède une fonction de réduction sont les travaux menés en 2014 qui montrent la réduction de BOLA2 oxydée par GRXS17 dans un système *in vitro* (Couturier et al., 2014). Des essais préliminaires ont été réalisés mais ils n'ont pas pu mettre en évidence une activité efficace de réduction de ponts disulfures. En effet, la protéine GRXS17 et son système ont été mis en contact avec la protéine BOLA2 oxydée avec un ratio 1:2

(GRXS17:BoIA2) et la consommation de NADPH a été suivie au spectrophotomètre à 340 nm. Cependant la consommation de NADPH au cours du temps est trop faible ce qui montre que l'activité de réduction de GRXS17 est très faible. Ces essais devront être poursuivie en modifiant les ratios enzyme-substrat ; la concentration du substrat pourrait être augmentée.

IV. Le seul domaine de GRXS14 complémente la fonction de GRXS17 dans la croissance à 20°C et à 22°C et dans la thermotolérance :

Le domaine seul de type TRX de GRXS17 complémente partiellement la croissance de la racine primaire à 20°C. C'est également le cas pour la lignée contenant les trois premiers domaines qui complémente également à 28°C. L'unique domaine de GRXS14 complémente la croissance racinaire à 20°C et partiellement à 28°C, la croissance de la rosette, la floraison et la mise à fleurs à 22°C mais ce n'est pas le cas à 28°C. Ces données suggèrent qu'un seul domaine GRX semble suffisant pour complémente la fonction de GRXS17 dans la croissance foliaire, la floraison et la mise à fleurs à 20/22°C mais pas lors de températures plus élevées ; la présence de la protéine GRXS17 avec ses multidomaines semble nécessaire. De plus, le seul domaine GRX de GRXS14 suffit à conférer la thermotolérance. GRXS14 fait partie des GRX de classe II chez *Arabidopsis thaliana* comme GRXS17 (Figures 21 et 26). C'est une protéine chloroplastique comme GRXS16 qui est très abondante dans les jeunes feuilles (Bandyopadhyay et al., 2008; Rey et al., 2017). Son expression est régulée lors de stress abiotiques, elle augmente lors de faibles températures, de stress salin et de sécheresse (Rey et al., 2017). Elle est capable de lier un cœur Fe-S et de complémente partiellement la fonction de la Grx5 de levure dans la synthèse et l'assemblage des cœurs Fe-S puis elle permet au mutant *grx5* d'accumuler moins de fer et de mieux résister au stress oxydatif (Cheng et al., 2006; Bandyopadhyay et al., 2008). Nous pouvons nous demander pourquoi un seul domaine GRX semble mieux complémente la fonction dans la croissance notamment à 20°C qu'une protéine GRXS7 sans son dernier domaine (Figure 50). Il faudrait répéter ces mêmes essais sur d'autres transformants de la construction sans le dernier domaine pour confirmer cette observation. Si elle est confirmée, nous pourrions imaginer qu'en absence de son dernier domaine GRXS17 ne se conforme pas correctement. Des questions se posent sur le rôle de ce dernier domaine qui est propre à certains Lycophytes et aux plantes supérieures. Un domaine GRX seul suffit à complémente la fonction de GRXS17 dans la croissance à 20-22°C et partiellement la croissance des racines à 28°C (Figures 50 et 51). Le seul domaine TRX complémente partiellement cette fonction mais pas à 28°C (Figure 50). Mais alors quelle est la fonction de ces domaines à 20°C notamment du domaine TRX et pourquoi leur présence

seule ne suffit pas à 28°C ? En effet, la protéine GRXS17 avec l'ensemble de ces domaines est nécessaire pour une croissance optimale. D'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle de chacun de ces domaines. Une protéine très peu caractérisée avec un domaine TRX très proche de celui de GRXS17 (91% d'homologie de séquence avec SMARTBLAST de NCBI) est présente chez *Arabidopsis thaliana* (AT4G32580). Elle s'aligne avec les TRX de type PICOT comme GRXS17 ou la GRX3 de mammifères (40-41%). Cette protéine de 160 acides aminés, a une localisation prédite dans le cytoplasme et la mitochondrie et elle serait très exprimée dans les graines sèches (données provenant de Tair10 et eFP Browser) (Klepikova et al., 2016). Etudier cette protéine pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de ce domaine TRX présent chez GRXS17 et partagé avec ses orthologues.

CHAPITRE 2

CHAPITRE 2 :

La glutarédoxine GRXS17 à cœurs Fe-S est une protéine chaperonne rédox-dépendante

Les travaux présentés dans le chapitre 1 ont permis de valider la fonction de GRXS17 dans la croissance de la plante. L'étude de différentes lignées complémentées a mis en évidence que la double localisation, les quatre cystéines des sites actifs notamment la C33 et la présence des quatre domaines de GRXS17 sont nécessaires pour une croissance optimale de la plante à 20°C et à 28°C. Pour son rôle dans la thermotolérance, les quatre cystéines paraissent également jouer un rôle et la localisation nucléaire semble suffisante à la fonction. Ce premier chapitre a donc permis de mettre en évidence les déterminants nécessaires de GRXS17 dans la croissance de la plante et un nouveau rôle de GRXS17 dans la thermotolérance. Cependant, nous n'avons pas déterminé la fonction moléculaire de GRXS17 dans ces voies.

Ce chapitre regroupe les résultats du second axe qui visait à explorer la fonction moléculaire de GRXS17. Ces travaux que j'ai en grande partie menés font l'objet d'un article qui a été récemment soumis pour publication et qui représente la principale partie de ce chapitre. Dans cet article, nous avons réexaminé la fonction cellulaire de GRXS17. Nous avons montré que, lorsqu'elle est produite de manière hétérologue dans des conditions aérobies, les cœurs Fe-S de GRXS17 sont rapidement perdus. Dans cette condition, GRXS17 acquiert une activité de chaperonne notamment une activité holdase nécessitant les cystéines de ses sites actifs. De plus, GRXS17 présente une activité de foldase indépendante des résidus Cys. L'activité holdase est associée à l'oligomérisation de GRXS17 impliquant à la fois la formation de ponts disulfures intermoléculaires et des interactions non covalentes. Enfin, nous montrons que GRXS17 est associée à un ensemble de protéines partenaires qui sont différentes après un stress thermique, ce qui suggère que le « switch » de fonction de GRXS17 en réponse au stress peut directement affecter les voies en aval. Certaines données de TMHT également présentées dans le chapitre 1 ont été intégrées à cet article pour illustrer le rôle de chaperonne de GRXS17 lors de stress thermique.

I. Article soumis : Fast redox response of iron-sulfur glutaredoxin GRXS17 activates its holdase activity

Fast redox response of iron-sulfur glutaredoxin GRXS17 activates its holdase activity

Laura Martins^{1,2,#}, Johannes Knuesting^{3,#}, Laetitia Bariat^{1,2}, Sven A. Freibert⁴, Christophe H. Marchand⁵, David Young^{6,7,8}, Nguyen Ho Thuy Dung^{6,7,8}, Wilhelm Voth⁹, Anne Debures^{1,2}, Julio Saez-Vasquez^{1,2}, Stéphane D. Lemaire⁵, Roland Lill⁴, Joris Messens^{6,7,8}, Renate Scheibe³, Jean-Philippe Reichheld^{1,2,*}, Christophe Riondet^{1,2}

¹ Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Université Perpignan Via Domitia, F-66860 Perpignan, France ;

² Laboratoire Génome et Développement des Plantes, CNRS, F-66860 Perpignan, France ;

³ Department of Plant Physiology, FB5, University of Osnabrück, D-49069 Osnabrueck, Germany

⁴ Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität, Robert-Koch-Strasse 6, Marburg 35032, Germany.

⁵ Institut de Biologie Physico-Chimique, UMR8226, CNRS, Sorbonne Université, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

⁶ VIB-VUB Center for Structural Biology, 1050 Brussels, Belgium

⁷ Brussels Center for Redox Biology, 1050 Brussels, Belgium

⁸ Structural Biology Brussels, Vrije Universiteit Brussel, 1050 Brussels, Belgium

⁹ Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

These authors contributed equally to this work.

* To whom correspondence should be addressed: E-mail: jpr@univ-perp.fr.

Jean-Philippe Reichheld, Tel: +33 4 68662225; Fax: +33 4 68668499; E-mail: jpr@univ-perp.fr.
Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Université Perpignan Via Domitia, F-66860 Perpignan, France.

Abstract

Iron-sulfur clusters (ISC) containing glutaredoxins (GRXs) are a subset of thiol reductases considered as components of the iron-sulfur protein assembly machinery. The plant nucleo-cytosolic GRXS17 coordinates up to three ISC, and as a holoenzyme, it is likely involved in the maturation of ISC target proteins. Here, we show that, in addition to its role in cluster biogenesis, GRXS17 functions as a redox-dependent chaperone. Oxidative stress together with heat stress induce loss of the ISC followed by sulfenylation of active site cysteines and subsequent formation of disulfide bonds between monomers, a process that leads to activation of its chaperone activity. Consistently, GRXS17 shifts from a low-MW form to high-MW complexes upon oxidation. This redox switch depends on the presence of conserved cysteines involved in ISC coordination, and in the N-terminal thioredoxin domain. Consistent with this chaperone function, we show that GRXS17 is required to tolerate moderate heat stress in a Cys-dependent manner and rapidly shifts its set of substrates after heat stress. All in all, we reveal the mechanism of an ISC dependent activity shift turning GRXS17 ISC-dependent activity into a holdase protecting the plant from heat-stress damage.

Significance Statement

Living organisms use a large panel of mechanisms to protect themselves from environmental stress. Particularly, heat stress induces misfolding and aggregation of proteins which are guarded by chaperone systems. Here, we show that in plant cells the iron-sulfur cluster glutaredoxin (GRXS17) is essential for thermotolerance to moderated heat stress (TMHT) through an inducible holdase chaperone activity involving its active site cysteines residues.

Importantly, its protective role is triggered by the switch from holo- to apo-GRXS17 which is boosted by high temperature and oxidation. This demonstrates how cells hijack an iron-sulfur cluster protein for protection from heat stress.

Introduction

Glutaredoxins are small ubiquitous thiol reductases belonging to the thioredoxin superfamily (Rouhier *et al*, 2008; Meyer *et al*, 2009). Their thiol-disulfide exchange capacity is generally dependent on glutathione as reductant and rely on an active site harboring at least one cysteine (Cys) residue. In plants, glutaredoxins are organized in multigene families including five different subgroups (Meyer *et al*, 2012). In *Arabidopsis*, members of the type-I and -II subfamilies are characterized by their capacity to bind a labile iron-sulfur cluster (ISC), by conserved amino acids in their active site (CG/SF/YS/C) and a glutathione moiety, a feature largely conserved within eukaryotic organisms (Lillig *et al*, 2005; Wingert *et al*, 2005; Rouhier *et al*, 2007; Bandyopadhyay *et al*, 2008; Couturier *et al*, 2011; Riondet *et al*, 2012; Berndt & Lillig, 2017). Remarkably, all type-II GRX possess a CGFS active site and are able to transfer their ISC to apo-enzymes *in vitro*, indicating a role of these GRX as ISC donors for Fe-S-containing enzymes (Bandyopadhyay *et al*, 2008; Moseler *et al*, 2015). Consistent with this activity, most type-II GRX are able to complement defects of the yeast *grx5* mutant deficient in mitochondrial ISC biogenesis (Bandyopadhyay *et al*, 2008; Moseler *et al*, 2015; Knesting *et al*, 2015). The labile character of the ISC in type-I and -II GRX suggests that they may exhibit additional activities. In absence of their ISC, some type-I GRX are able to act as reductants of redox-labile disulfide bonds in proteins such as in methionine sulfoxide reductase and peroxiredoxins or exhibit deglutathionylation activity towards glutathionylated forms of the GAPDH (Zaffagnini *et al*, 2008; Couturier *et al*, 2011; Riondet *et al*, 2012). PICOT-like GRX are multi-domain type-II GRX found in most eukaryotic organisms (Berndt & Lillig, 2017). While in most organisms, PICOT proteins are composed of one or two adjacent GRX domains with CGFS active site preceded by a TRX-like domain, the PICOT of higher plants, GRXS17, contains a third CGFS-containing GRX domain (Couturier *et al*, 2009). *In vitro*, GRXS17 exists as a homodimer and each GRX-CGFS domain coordinates an ISC in a glutathione dependent manner (Knesting *et al*,

2015). GRXS17 is able to complement the defect of the yeast *grx5* deletion mutant in mediating transfer of clusters to acceptor proteins (Bandyopadhyay *et al*, 2008; Knesting *et al*, 2015). Affinity chromatography approaches using crude extracts have shown the association of GRXS17 with known cytosolic Fe-S assembly (CIA) components like MET18, and with other cytosolic ISC-containing proteins like xanthine dehydrogenase 1 (XDH1) and thiouridylase subunits 1 and 2 (Iñigo *et al*, 2016). Consistent with its nucleo-cytosolic localization, GRXS17 interacts with the BolA2 factor (Couturier *et al*, 2014) and with NF-YC11, a subunit of the NF-Y transcription factor complex (Knesting *et al*, 2015). However, for all these partners, the role of the ISC remained enigmatic. Genetic evidence suggests a protective role of GRXS17 in thermal, genotoxic and drought stresses (Cheng *et al*, 2011; Wu *et al*, 2012; Wu *et al*, 2017; Iñigo *et al*, 2016; Hu *et al*, 2017), in meristem development (Knesting *et al*, 2015), and in hormonal responses (Cheng *et al*, 2011).

Here, we reexamined the cellular function of GRXS17. We showed that when heterologously expressed under aerobic conditions, the ISC of GRXS17 is rapidly lost, and GRXS17 acquires redox-dependent holdase chaperone activity requiring its active-site cysteines. Moreover, GRXS17 exhibits a foldase activity which is independent of Cys residues. The holdase activity is found to be associated with oligomerization of GRXS17 involving, both intermolecular disulfide-bond formation and noncovalent interactions. Confirming the importance of the chaperone activity of GRXS17, a *grxs17* knock-out mutant was found to be highly sensitive to heat stress. Mutant complementation experiments with different cysteine variants of GRXS17 indicate the crucial role of the active site cysteines in heat-stress response. Finally, we show that GRXS17 associates with a different set of partner proteins after heat stress, suggesting that stress-responsive functional switch of GRXS17 may directly affect downstream pathways.

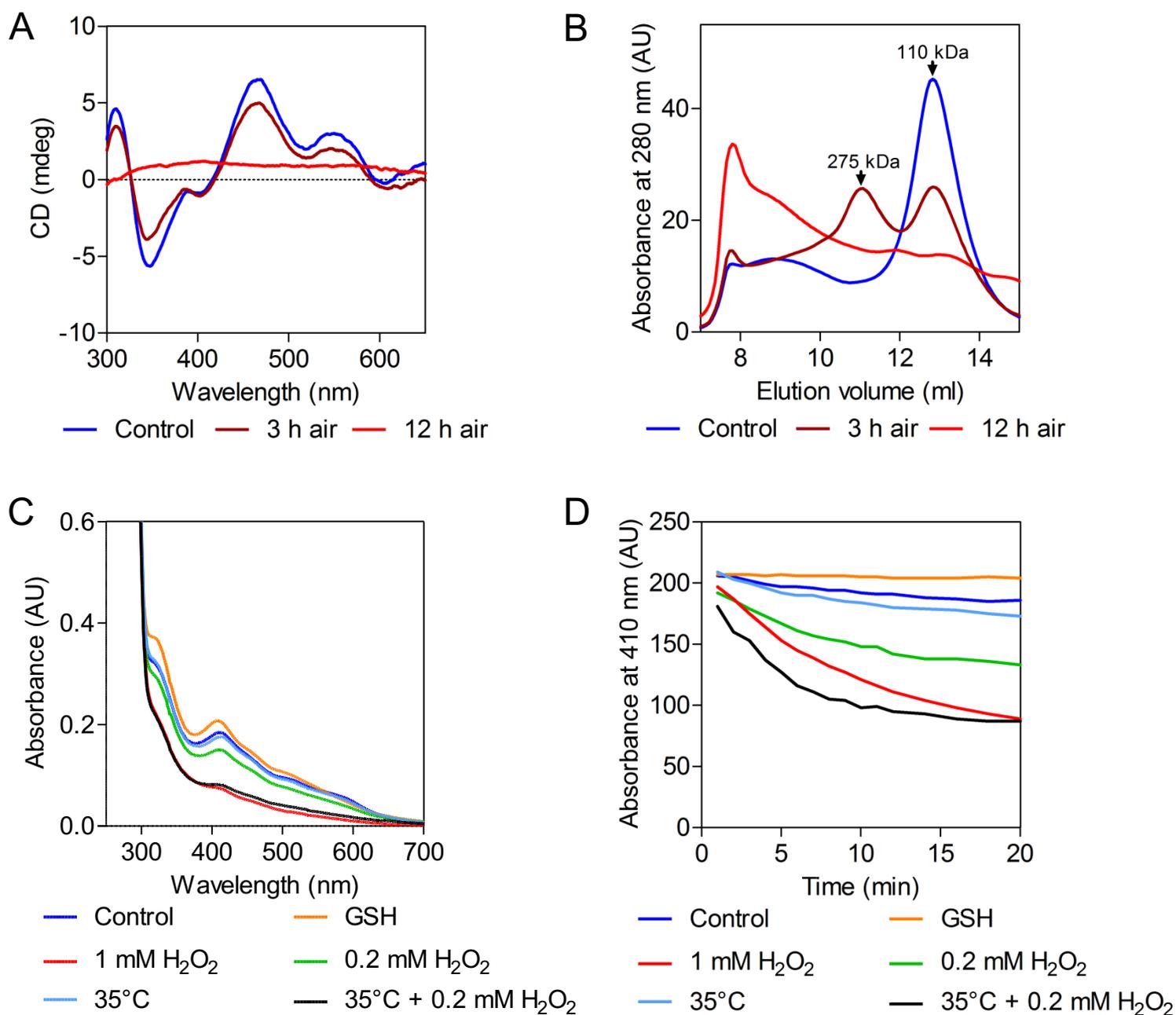


Figure 1: Fe-S cluster stability and oligomerization of reconstituted GrxS17. (A) Visible Circular Dichroism (CD)-spectra of reconstituted holo-GRXS17 under reducing conditions (blue) and after oxygen treatment (3 h brown; 12 h red) at room temperature. (B) Size-exclusion chromatography (Sephacryl S300 HR) under anaerobic conditions with reconstituted GRXS17 and after the respective oxygen treatments. (C) Absorption spectra of GRXS17 subjected to H₂O₂ and heat treatments. UV-VIS absorption spectra were measured after *in vitro* reconstitution in under anaerobic conditions and after 20 min at 20°C (blue), GSH (2.5 mM orange), H₂O₂ treatment at 20°C (0.2 mM green; 1 mM red), heat treatment at 35°C in presence of 0.2 mM H₂O₂ (black) or without H₂O₂ (light blue). (D) Relative absorption at 410 nm of GRXS17 subjected to the same treatments as in (C). Each experiment is representative of three biological repetitions.

Results

Loss of ISC and oligomerization under oxidative-stress and heat-conditions

When purified under anaerobic conditions, GRXS17 adopts a dimeric form coordinating up to three ISCs together with six molecules of GSH (Knesting et al., 2015). As ISC are highly sensitive to oxidizing conditions, we examined structural modifications of GRXS17 upon transfer to aerobic conditions. As expected, anaerobically reconstituted GRXS17 ISC possessed a circular dichroism (CD) spectrum typical for the presence of [2Fe-2S] clusters (Fig 1A). When exposed to oxygen, the spectral footprint of the ISC was progressively destabilized and finally lost, confirming the sensitivity of the bound ISC towards oxidation. In parallel to the loss of the ISC, size-exclusion chromatography (SEC) revealed a progressive shift of GRXS17 yielding a high-MW form of >250 kDa after 3 h of air exposure. After 12 h, a high-MW complex above the range of the maximum resolvable size of the size exclusion column (>1500 kDa) was formed, suggesting an increasing degree of protein oligomerization under oxidizing conditions (Fig 1B). However, the loss of the ISC had a mild effect on the overall structure of the protein as determined by CD spectroscopy (Fig EV1).

We also examined the stability of ISC upon exposure to H₂O₂ and high temperature. As previously shown (Knesting *et al*, 2015), the UV-VIS spectrum of the reconstituted GRXS17 exhibited absorbance peaks at 320 and 420 nm, characteristic for [2Fe-2S] clusters. Upon H₂O₂ treatment, the ISC were lost in a dose-dependent manner without perturbing the general structure of the protein, while high temperature (30-35°C) had little effect on the stability of the cluster (Figs 1C-D and EV2). However, combining H₂O₂ and high-temperature treatment dramatically accelerated the loss of the ISC, demonstrating that high temperature potentiates the oxidative effect on ISC stability.

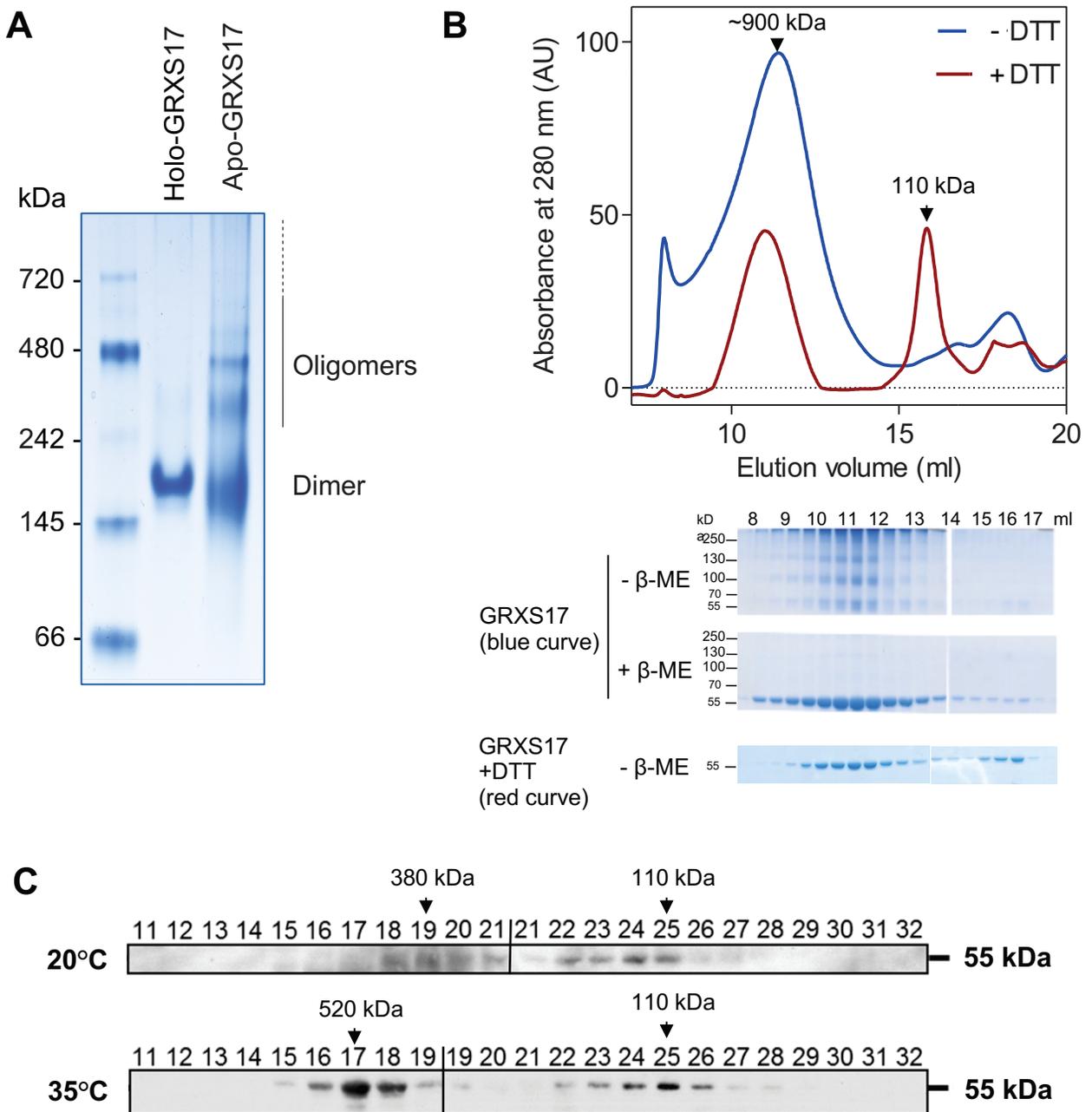


Figure 2: GRXS17 forms high molecular weight complexes. (A) Migration of GRXS17 with or without the cluster in native PAGE (B) Size-exclusion chromatography analysis (Superose 6) of GRXS17 protein (740 μ g) without the cluster. The protein were reduced with 10 mM DTT (red) or not (blue) before loading on the column. Aliquots of each fraction (30 μ L) were subjected to SDS-PAGE in presence (+ β -ME) or absence (- β -ME) of 10 mM β -mercaptoethanol. (C) Size-exclusion chromatography analysis (Sephacryl S300 HR) of crude protein extracts from Arabidopsis seedlings cultivated 14 days at 20°C and further treated for 2 h at 35°C. The GRXS17 protein was detected after western blotting and immunodecoration using an anti-GRXS17 serum. Numbered lines correspond to the protein fractions. Protein size of the respective fractions was obtained after calibrated using marker proteins. At 20°C, GRXS17 was found in fractions 22-25 corresponding to the expected MW of a GRXS17 dimer (~110 kDa). A GRXS17 signal was also found in fractions 18-21, corresponding to GRXS17 HMW complexes (~380 kDa). These HMW complexes are composed of GRXS17 oligomers (e.g. tetrameric/octameric state and/or association with other protein partners). At 35°C, GRXS17 was also found in fractions corresponding to GRXS17 dimer (~110 kDa) but a much more pronounced GRXS17 signal was found in fractions 16-18, corresponding to GRXS17 HMW complexes than at 20°C (~520 kDa).

GRXS17 oligomerizes through intermolecular disulfide bonds and noncovalent interactions

To understand the molecular rearrangements occurring after ISC loss upon oxidative treatments, we examined the oligomeric status of GRXS17 by native gel electrophoresis. As expected, holo-GRXS17 migrated as a single band likely corresponding to a dimeric form. However, after being stored under aerobic conditions for more than 24 h, oligomers were formed, underscoring the high sensitivity of holo-GRXS17 to aerobic conditions (Fig 2A). HMW complexes were also detected at ~900-1000 kDa after gel filtration (Fig 2B). When separating these fractions by non-reducing SDS-PAGE, a laddering profile was observed, suggesting that the HMW-oligomeric structures are partially destabilized by SDS and that the remaining GRXS17 oligomers are linked by disulfide bonds. Under reducing conditions, a single ~50-kDa band was detected, corresponding to the apparent MW of the GRXS17 monomer (Fig 2B). These data indicate that native GRXS17 forms oligomeric structures coordinated both by disulfide bonds and non-covalent interactions. Consistently, incubation of the native GRXS17 with DTT prior to SEC led to a decrease of the ~900-1000 kDa peak and a concomitant increase of the 110 kDa peak, likely corresponding to homodimeric GRXS17 (Fig 2B). Further SDS-PAGE analyses indicated that these peaks correspond to oligomeric and dimeric GRXS17 coordinated by non-covalent interactions (Fig 2B). Moreover, H₂O₂ treatment of reduced GRXS17 triggered a massive oligomerization of the protein, indicating that oligomerization is further favored by oxidizing conditions (Fig EV3). Consistently, upon H₂O₂ treatment in the presence of a carbon nucleophile, dimedone thioether bond formation was detected at Cys residues, indicating that S-sulfenylation occurs prior to disulfide bond formation (Fig EV4).

In order to analyze the role of the active-site Cys residues in oligomerization, mutated forms of GRXS17 were subjected to SEC analysis. Interestingly, the TRX-domain mutant C33S, behaved similarly to the wild-type GRXS17 reduced by DTT (Fig EV5A), namely exhibiting comparable peaks at ~900-1000 kDa and 110 kDa. Moreover, the distribution between these peaks was not influenced by DTT treatment prior to SEC, indicating that Cys 33 plays a major role in the

oligomerization, very likely by forming intermolecular disulfide bonds (Fig EV5A). In contrast, mutation of the active site Cys residues of the three GRX domains (C179/309/416S) affected oligomerization independently of redox treatment, shifting the HMW peak to the lower ~600 kDa range, with DTT treatment further shifting a portion of the HMW oligomers to dimeric and monomeric forms (Fig EV5B). Strikingly, mutation of all active site Cys residues completely abolished oligomerization, GRXS17-C33/179/309/416S eluting most exclusively in its dimeric form (Fig EV5C).

Collectively, the data show that recombinant GRXS17 is able to oligomerize by forming intermolecular disulfide bonds in which, active site Cys 33 of the TRX-domain plays a major role. Apart from being involved in ISC coordination, C179, C309 and C416 are also important for maintaining non-covalent interactions between protomers. Finally, the active site residues C33, C179, C309 and C416 do not appear to be required for maintaining a dimeric conformation.

GRXS17 structure is changed upon oxidation

The effect of reducing/oxidizing agents on the conformation of GRXS17 was determined by CD spectroscopy. Treatment of either wild-type, or GRXS17-C33/179/309/416S, with 100-fold excess of either Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) or H₂O₂ resulted in a mild but significant change in secondary structure composition of wild-type, but not GRXS17-C33/179/309/416S (Fig EV6A). H₂O₂-treated GRXS17 was found to possess 5.6% less α -helix, and 3.7% more β -strand content relative to TCEP-treated GRXS17 (Fig EV6B). Whereas the CD spectrum of TCEP-treated GRXS17 can be interpreted as a 3-layer(alpha-beta-alpha) sandwich fold, typical for GRX, the CD-spectrum of H₂O₂-treated GRXS17 was found to more closely resemble a 2-layer sandwich or α – β -complex fold. The rate of change in secondary structure upon H₂O₂ addition to GRXS17 was determined by fitting of $[\theta]$, 222 nm, as a function of time to a one-phase decay model (Fig EV6C-D). This analysis

indicated a preliminary estimate of the rate of structural change of $k \sim 1.9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, and a half-life time of 22 min.

The change in secondary structure content of GRXS17 upon oxidation can correspond either to a localized or a global conformational change which is likely to involve the partial unfolding of α -helices and formation of β -strands. As this conformational change does not occur in the quadruple Cys mutant GRXS17-C33/179/309/416S, we can conclude that this structural change depends on the oxidation of the catalytic cysteines and the formation of disulfide bonds in wild-type GRXS17.

GRXS17 forms oligomers *in planta*

In order to study GRXS17 interactions *in vivo*, total soluble protein extracts prepared from *Arabidopsis in vitro* seedlings grown at standard temperature (20°C) and exposed to heat stress (35°C for 2h) were fractionated by SEC (Fig 2C). Western blot analyses of eluted fractions revealed a peak containing GRXS17 eluting at ~100–150 kDa (lanes 23–25), corresponding to a molecular weight consistent with a dimeric form of GRXS17 (~110 kDa) (Knuesting *et al*, 2015). Moreover, a GRXS17 signal was also detected in fractions (lanes 18–21) corresponding to a HMW (~380 kDa), suggesting that GRXS17 forms HMW complexes *in vivo* (Fig 2C). While these data are consistent with the *in vitro* analyses (Fig 1B; Fig 2A, B), and suggest that GRXS17 forms oligomers *in vivo*, we cannot rule out that GRXS17 dimers associate with other proteins. Interestingly, plants subjected to heat stress accumulated higher levels of oligomeric forms eluting at a HMW range (lane 16-18, corresponding to 520 kDa), indicating that heat stress is triggering GRXS17 protein/protein association (Fig 2C).

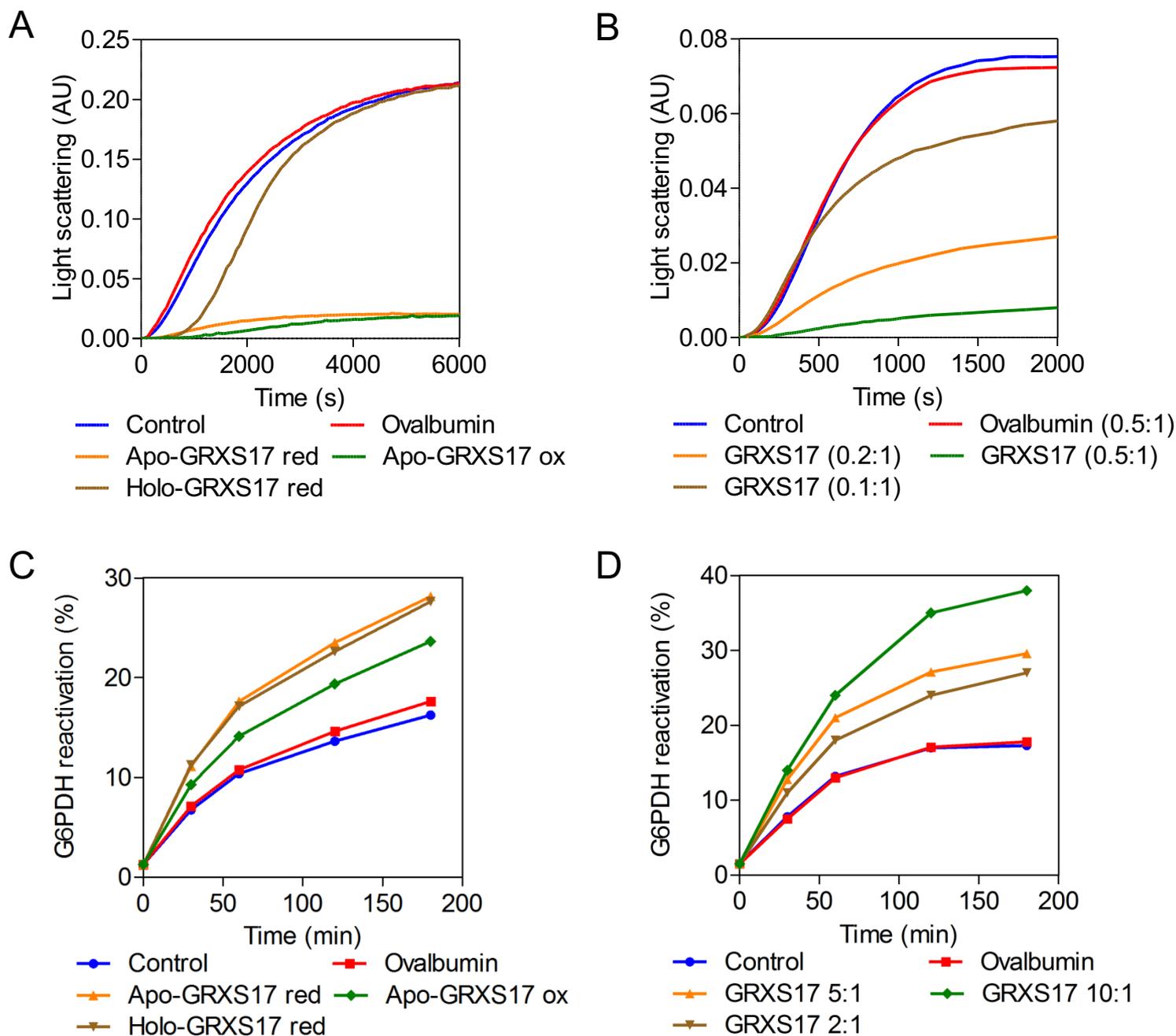


Figure 3: GRXS17 exhibits holdase and foldase chaperone activities. (A-B) GRXS17 holdase activity towards citrate synthase (CS) was measured by light scattering. (A) Holo-GRXS17 or apo-GRXS17 in their reduced or oxidized forms were incubated with CS at a 0.5:1 ratios at 43°C. Apo-GRXS17 but not holo-GRXS17 protects CS from temperature-induced precipitation. (B) Increasing ratios of apo-GRXS17/CS. (C) GRXS17 foldase activity was measured by reactivation of the glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). Holo-GRXS17 or apo-GRXS17 in their reduced or oxidized forms were incubated with G6PDH at 5:1 ratios at 30°C. Apo-GRXS17 and holo-GRXS17 support reactivation of G6PDH. (D) Increasing concentrations of GRXS17 but not ovalbumin (orange), reactivate G6PDH (dark blue). Data are representative of three different experiments.

Holo-apo redox switch of GRXS17 activates holdase activity upon oxidation

Molecular chaperone activities are often associated with oligomerization and thermotolerance functions. Therefore, the potential role of GRXS17 as a molecular chaperone was analyzed using different chaperone substrates. In order to monitor holdase activity, we used mitochondrial citrate synthase (CS) as client protein (Fig 3). We analyzed the effect of GRXS17 on high-temperature-induced aggregation of CS, a classical assay to monitor the activity of molecular chaperones *in vitro* (Voth *et al.*, 2014). Incubation of CS with apo-GRXS17 prevented thermal aggregation at 43°C (Fig 3A). Increasing the apo-GRXS17/CS ratios progressively blocked CS aggregation which was fully prevented at a subunit molar ratio of 0.5:1 (Fig 3B), an effect stronger than that described for other known holdase of different organisms (e.g. HSP33, Get3, CnoX, TDX,...) (Jakob *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2009; Voth *et al.*, 2014; Goemans *et al.*, 2018). By contrast, in the absence of GRXS17 or in the presence of an excess of ovalbumin, a protein devoid of chaperone activity, CS was significantly aggregated after 15 min (Fig 3A). Interestingly, comparable holo-GRXS17/CS ratios did not prevent CS aggregation, indicating that the holdase activity of GRXS17 is associated with the apo-GRXS17 form (Fig 3A).

We also monitored the foldase activity of GRXS17 by using glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) as a substrate. To distinguish between foldase and disulfide reductase activities, we used a Cys-free G6PDH chemically denatured by urea-treatment. Increasing apo-GRXS17/G6PDH ratios progressively restored the G6PDH activity (Fig 3C-D). This reactivation was significantly faster in the presence of GRXS17, with nearly 36% recovery after 3 h at a 10:1 ratio of GRXS17:G6PDH). Holo-GRXS17 similarly restored G6PDH activity, indicating that the foldase activity of GRXS17 is independent of the presence or absence of the ISC (Fig 3C-D). We also established that these activities are ATP-independent (Fig EV7). Collectively, our data show that GRXS17 can adopt both a holdase and a foldase activity *in vitro*, and that the holdase activity is specific for the apo-form.

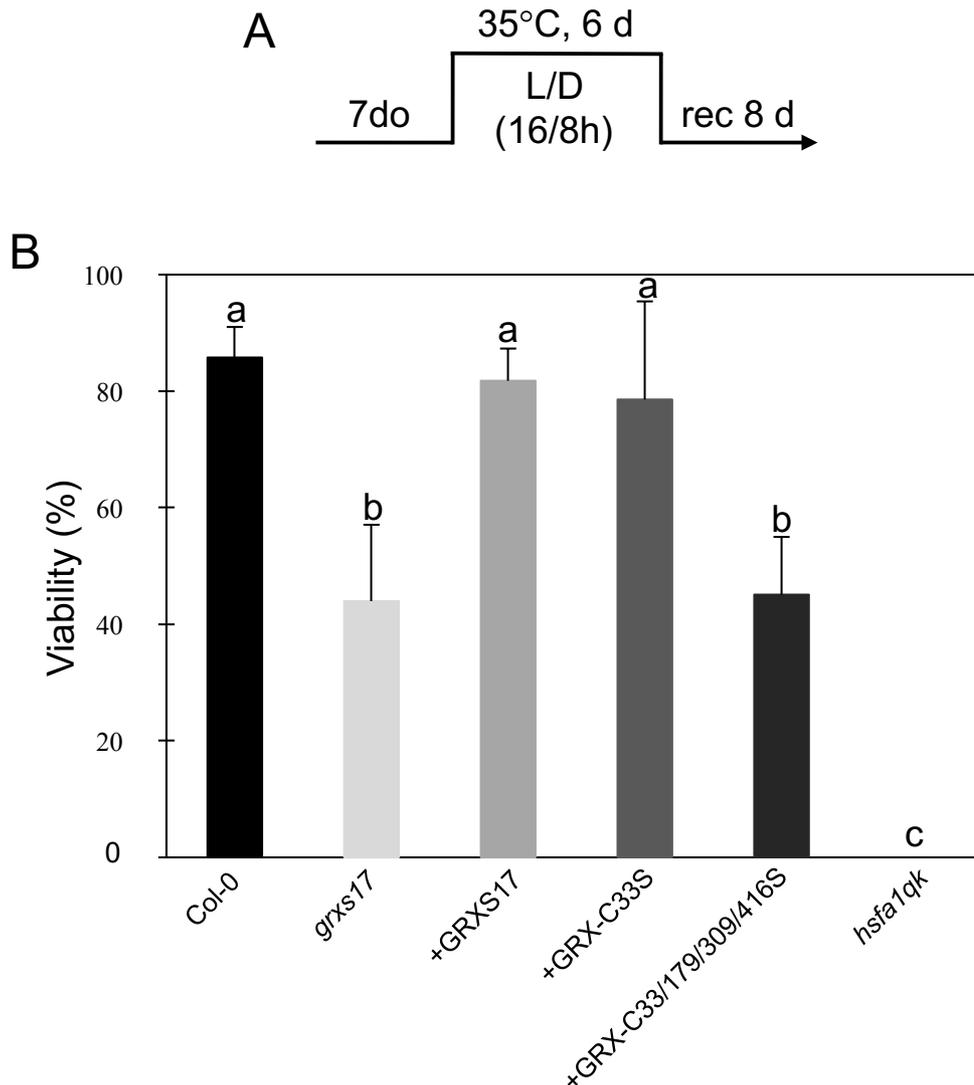


Figure 4: GRXS17 is specifically involved in Thermotolerance to Moderated High Temperature. (A) Plants were subjected to a heat-stress regime according to the Thermotolerance to Moderated High Temperature (TMHT) experiment. Seeds were grown for seven days at 20°C before they were transferred to 35°C during for six days. Temperature was decreased again to 20°C for eight more days before sample analysis. do: days old. rec: recovery. (B) Following the TMHT, the growth condition of the now 21-day old plants were assessed. Wild-type plants (Col-0), Heat-Shock Factor A1 quadruple knock-out mutant (*hsfa1qk*), *grxs17* knock-out mutant (*grxs17*), *grxs17* mutant complemented with a *Pr35S:GRXS17:GFP* construct expressing the GRXS17:GFP fusion protein (+GRXS17), the GRXS17-C33S:GFP protein (+GRXS17-C33S) or the GRXS17-C33/179/309/416S:GFP (+GRXS17-C33/179/309/416S) protein. 21 days old plants were observed at the end of the TMHT experience. (C) Viability of the plants after the TMHT experiment was assessed by recovery of the shoot growth. Data are means of 4-10 biological repetitions +/- SE, n = 20-25. The letters a, b and c indicate a significance of $p > 0.1$, $p < 0.001$ and $p < 0.00001$ respectively by the Student's t-test.

Holdase activity of GrxS17 is associated with oligomerization

The capacity of apo-GRXS17 to oligomerize depends on both disulfide bonds involving active site Cys residues and non-covalent electrostatic interactions (Figs 2, EV3 and EV5). In order to unveil which forms are associated with chaperone activities, Cys/Ser-mutated variants of GRXS17 were tested for chaperone activity using cytMDH1 as a substrate (Fig EV8A). The GRXS17 (C33S), in which oligomerization mostly occurs through non-covalent interactions (Fig EV5C), exhibited holdase activity (Fig EV8A) as did GRXS17-C179/309/416S which also forms oligomers. However, GRXS17-C33/179/309/416S for which oligomerization is abolished (Fig EV5C) did not display holdase activity (Fig EV8A). This suggests that the holdase activity is dependent on GRXS17 oligomerization and is thus dependent on active-site Cys residues. To confirm this point, we subjected apo-GRXS17 to the chaotropic agent guanidinium hydrochloride before testing holdase activity. Denaturation abolished the holdase activity of reduced GRXS17, but not of oxidized GRXS17, confirming the dependence of the holdase activity on the oligomeric state of GrxS17 (Fig EV9). Finally, the foldase activity of GRXS17 was barely affected by Cys mutations of GRXS17, suggesting that oligomerization is not required for foldase activity (Fig EV8B).

GRXS17 is involved in tolerance to moderate heat stress

GRXS17 has been suggested to be involved in plant thermotolerance (Cheng *et al*, 2011; Knuesting *et al*, 2015). In order to further explore this function, we subjected *grxs17* mutant plants to different heat-stress regimes (Yeh *et al*, 2012). The viability of the *grxs17* mutant was similar to wild-type plants for both Short-term Acquired Thermotolerance (SAT) and Long-term Acquired Thermotolerance (LAT) regimes (Fig EV10). In contrast, a mutant lacking the heat-shock protein 101 (HSP101) chaperone is hypersensitive to all heat-stress regimes, indicating that GRXS17 does not overlap with HSP101 functions in SAT and LAT. Nevertheless, compared to wild-type plants, *grxs17*

was significantly more sensitive to a Tolerance to Moderate Heat Stress (TMHT) regime (Fig 4) indicating that GRXS17 functions cannot be replaced by other heat-stress chaperones under TMHT regime. The thermosensitive phenotype of *grxs17* was fully complemented by overexpressing the full-length GRXS17:GFP fusion, indicating that the TMHT phenotype of *grxs17* is due to the loss of GRXS17 function and that the GFP does not perturb the function of the protein (Figs 4C and EV11). Importantly, while overexpression of the GRXS17-C33S:GFP fusion restores the wild-type phenotype, the expression of GRXS17-C33/179/309/416S:GFP failed to complement the mutant phenotype (Figs 4C, EV11 and EV12). This observation is consistent with a role of GRXS17 holdase activity in the tolerance to moderate heat stress.

GRXS17 associates with proteins in HMW and LMW complexes

Next, we sought to identify GRXS17 partners by using co-immunoprecipitation (Co-IP) techniques. To this end *grxs17* mutant plants were transformed with a *Pr35S:GRXS17-FLAG-HA* construct. Expression of the construct was verified by immunoblot and its functionality was assessed by complementation of the phenotype under TMHT (Fig EV13). Total protein extracts from GRXS17:FLAG-HA expressing plants grown at 20°C or shifted for 2 h to 35°C were collected for Co-IP and mass spectrometry analyses. Non-specific GRXS17 contaminants were analyzed within the same experiments using *grxs17* mutant plants expressing a GRXS17 protein devoid of FLAG tag. We employed a label-free quantitative proteomic approach to identify proteins significantly enriched after Co-IP by comparison with the control samples. Five biological replicates were analyzed by mass spectrometry after FLAG immunoprecipitation of total protein extracts from plants expressing GRXS17:FLAG-HA or non-tagged GRXS17 (control) grown at 20°C or shifted for 2 h to 35°C. GRXS17 was the only protein significantly enriched in the tagged samples after IP ($P < 0.05$, Bonferroni corrected Student T-test). In addition, we identified 23 proteins from plants grown at 20°C and 12 proteins from plants shifted to 35°C that were present and quantified in at least 3 of the 5

replicates from the tagged strain and not found in any of the 5 replicates from control non-tagged plants. Several non-specific interactants such as chloroplastic proteins were recovered with this all or nothing approach. More likely interactants like a protein disulfide isomerase (PDIL) and the antioxidant enzyme monodehydroascorbate reductase (MDAR) were identified at 20°C. Remarkably, after the 2h temperature shift to 35°C, a different set of interactions partners was identified, as only 4 proteins were found in both temperature. Among them, we systematically identified the nucleocytoplasmic BOLA2 (Table EV1). This interaction is consistent with previous studies that reported interaction of GRXS17 with BOLA2 (Couturier *et al*, 2014). Finally, to identify GRXS17 partners in specifically in LMW and HMW complexes, total protein extracts from plants grown at 20°C or shifted for 2 h to 35°C were first separated by SEC, and LMW and HMW fractions containing GRXS17:FLAG-HA (Fig 2C) were collected for Co-IP and mass spectrometry analysis. Unfortunately, a simple subtractive analysis between the samples could not identify most of the interactants identified in the previous approach, (Table EV1). However, BOLA2 was identified after Co-IP on LMW and HMW fractions, suggesting that BOLA2 may be a major interactant of GRXS17 dimers or oligomers and may be associated with the molecular chaperone activity of GRXS17.

Discussion

Apo-GRXS17 switches to holdase activity upon stress

During periods of heat stress, living organisms need to rapidly adapt to cope with the damaging effects of temperature. The sessile nature of plants makes them particularly exposed to heat stress. As in other organisms also in plants, a set of heat heat-shock proteins are acting as molecular chaperones to prevent heat damage causing protein inactivation and aggregation. While most heat-shock protein functions are heat inducible, the mechanism of their activation is not well known

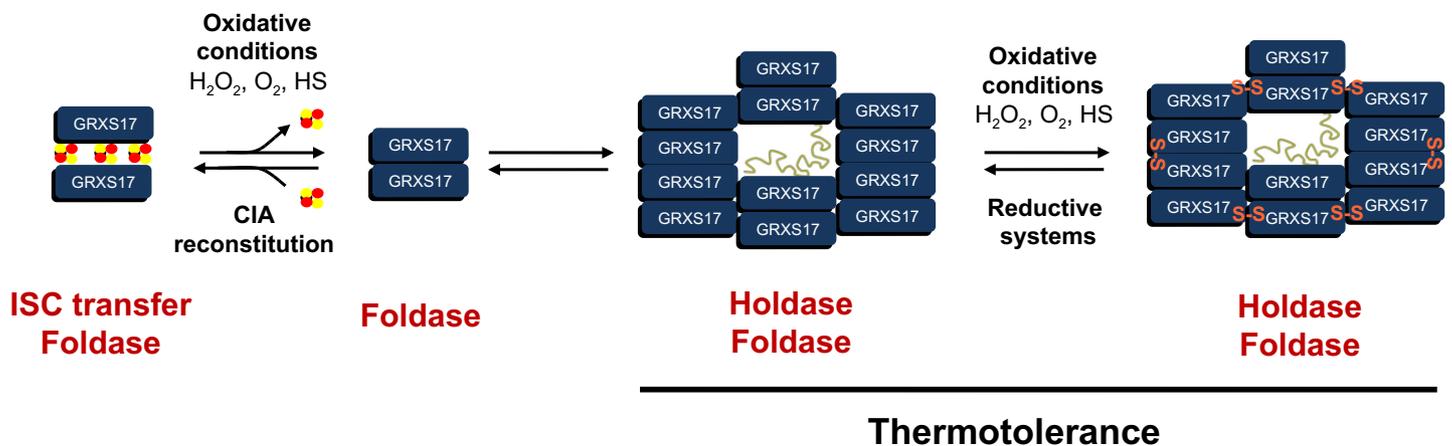


Figure 5: Model of the GRXS17 redox switch. Under reducing conditions, the holo-GRXS17 forms a dimer which coordinates an iron-sulfur cluster (ISC). In this form, GRXS17 can transfer ISC to cytosolic and nuclear target proteins (e.g. BolA). Under oxidative conditions (H_2O_2 , O_2 , Heat Stress (HS)), ISC are unstable and GRXS17 switches to an apo-dimeric form with a foldase activity. Dimers can spontaneously associate to oligomeric forms and further oxidation induces oligomeric structure through formation of intermolecular disulfide bonds including active site Cys. In this form, GRXS17 acquires holdase activities and thermotolerance. The oligomeric form can be reduced to recover the apo-dimeric GRXS17 and the ISC might be reconstituted by the cytosolic Fe-S assembly (CIA) complex.

(Hartl *et al*, 2011). Here we demonstrate that the ISC-containing protein GRXS17 rapidly switches to a holdase chaperone function upon heat stress. This switch occurs within minutes by a redox- and temperature-dependent destabilization of the ISC and a concomitant disulfide bond formation (Fig 5). Redox switch functions of ISC-containing GRX were previously shown to occur under oxidizing conditions. In these conditions, the apo-GRX acquires GRX-thiol reduction activities (Lillig *et al*, 2005; Berndt *et al*, 2007; Rouhier *et al*, 2007; Bandyopadhyay *et al*, 2008; Riondet *et al*, 2012). By contrast, apo-GRXS17 is inactive as a thiol reductase as previously reported for other class II GRX (Bandyopadhyay *et al*, 2008; Knesting *et al*, 2015; Moseler *et al*, 2015). This property was proposed to be linked to the specificity of their active site and their low reactivity with GSH (Moseler *et al*, 2015; Begas *et al*, 2017).

Remarkably, the active site cysteines of GRXS17 are crucial for this functional redox switch as they coordinate both the ISC and quickly respond to an oxidizing environment such as aerobic conditions, H₂O₂ exposure or heat stress. As such, GRXS17 may act as a sensor of cellular redox modifications. In fact, high temperature by itself does not destabilize the ISC but potentiates the oxidation effect possibly by changing the conformation of the protein. Apo-GRXS17 acquires the capacity to oligomerize by formation of both non-covalent interactions and disulfide bonds (Fig 5). Site-directed mutagenesis clearly demonstrated the key role of active site Cys residues (C33, C179, C309 and C416) in a (non-)covalently mediated oligomerization (Figs EV5C and EV6). Under oxidizing conditions, oligomerization is likely facilitated by rapid Cys sulfenylation (Fig EV4 and Waszczak *et al*, 2014). Therefore, the thiol-reduction capacity of apo-GRXS17 may also be limited by rapid oligomerization of the protein under oxidative conditions (Ströher *et al*, 2016).

Proteins which combine a chaperone function with a redox activity have been described previously. For example, plant thiols reductases proteins TRXh3, TDX and NTRC exhibit chaperone activities triggered by oxidative stress and heat shock exposure, leading to shift of the protein structure from low MW species to high MW complexes (Lee *et al*., 2009; Chae *et al*., 2013; Park *et al*., 2009b). In

the 2-cys peroxiredoxin, overoxidation of the catalytic cysteine triggers oligomerization and chaperone activity (Liebthal *et al*, 2018). GRXS17 is different as it does not exhibit oxidoreductase activity and show a much more efficient holdase activity as other thiol reductases (Fig 2). Remarkably, the key step required to enable its holdase chaperone activity shift is triggered by redox-dependent ISC destabilization. This is to our knowledge the first example of an ISC protein turning to a chaperone upon holo-apo switch. The most similar example is probably Hsp33 in *E. coli* which coordinates zinc via conserved cysteines. Upon oxidation with H₂O₂, zinc is released from the cysteines and disulfide bonds are formed. Therefore, zinc coordination, oxidation state and activation state of Hsp33 are directly linked to the redox state of the environment (Jakob *et al.*, 1999, 2000; Winter *et al.*, 2008). In yeast, the cytosolic ATPase Get3 also turns into an effective ATP-independent chaperone when oxidized (Voth *et al*, 2014). In *E. coli*, the holdase activity of the chaperedoxin CnoX protein and its ability to protect substrates from irreversible oxidation is activated by chlorination upon bleach treatment (Goemans *et al*, 2018). Whether GRXS17 acts to protect its substrates from oxidation remains to be determined.

GRXS17 has a constitutive foldase activity

Unlike its holdase activity, the foldase activity of GRXS17 is not restricted to the apo-form and does not require oligomerization (Figs 3 and EV7). Here, GRXS17 is likely acting as a housekeeping chaperone, refolding cytosolic (or nuclear) nascent peptides or refolding misfolded peptides. Interestingly, it is also independent of ATP supply used by most prokaryotic (e.g. GroEL-GroES) and eukaryotic foldases (e.g. HSP70, HSP90) to perform their foldase activity (Mayer, 2010) (Hartl *et al*, 2011). In another hand, recent data established a potentially widespread mechanism whereby ATP-independent chaperones (e.g. Spy) assist in protein refolding (Stull *et al*, 2016). The foldase activity of GRXS17 is also independent of its active-site Cys (Fig EV8). Thus, GRXS17 functions differentially than disulfide isomerase (PDI) or cyclophilin, which catalyze disulfide formation and

isomerization and exhibit folding activities (Park *et al*, 2013; Ali Khan & Mutus, 2014). Since two additional Cys are present in GRXS17, their involvement in the GRXS17 foldase-activity cannot be ruled out.

GRXS17 protects plant from heat stress

The cytosolic compartment is known to be highly reduced in eukaryotic organisms grown under non-stress conditions (Schwarzländer *et al*, 2008). It is likely that the major GRXS17 form occurs as a ISC-containing dimeric form under standard growth temperature. However, in heat-stressed plants, a significant proportion of the protein switch to an oligomeric form, likely due to the accumulation of ROS in these plants (Choudhury *et al*, 2017; Dickinson *et al*, 2018). Consistently, we found HMW complexes in protein extracts subjected to heat stress in SEC experiments (Fig 2C). This redox switch appears to be necessary for plant survival under heat stress, because the *grxs17* mutant is highly sensitive to TMHT and other moderate higher temperature (28°C) regimes (Cheng *et al*, 2011; Knesting *et al*, 2015). The lethality of the *grxs17* mutant clearly suggests that GRXS17 is able to maintain plant viability under moderate heat stress conditions and to take over the function of other heat stress proteins. It also demonstrates that it plays a unique role among redox-activated chaperone like 2-cys PRX, TRXh3, TDX. This might rely on its cytosolic/nuclear subcellular localization (2-cys PRX are chloroplastic), but also on the peculiar mechanism (i.e. ISC release under stress) of its chaperone activation compared to other heat stress-related chaperones (Stull *et al*, 2016). The unique function of GRXS17 might also rely on a specific set of its partner proteins. Remarkably, our attempt to identify GRXS17 partner proteins under heat stress conditions, have highlighted the low overlap between proteins immunoprecipitated at 20°C and after the higher temperature shift, suggesting that the set of proteins interacting with GRXS17 rapidly changes upon heat stress. Whether this GRXS17 partner switch is associated with a shift of functions will have to be further explored.

Homologues of GRXS17 occur in all plants as well as in most other organisms (Couturier *et al*, 2009). Their functions in iron metabolism have been extensively documented (Encinar del Dedo *et al*, 2015; Berndt & Lillig, 2017). It is likely that the switch to chaperone functional which is described here might be conserved in other organisms. Thus, unlike other ISC-containing proteins in which cluster release generally impairs protein function (Lill, 2009; Klinge *et al*, 2007; Berndt & Lillig, 2017), GRXS17 uses this fast redox switch mechanism to activate a new function and protecting plants from heat stress. The fact that this mechanism relies on existing GRXS17 protein allows a rapid response to stress, much more rapidly than by a transcriptional regulation.

Materials and Methods

Plant materials and growth conditions

Wild type (WT) *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0 (Col-0), mutant *grxs17* (SALK_021301) were already characterized (Knesting *et al*, 2015) and various complemented lines were used in this study.

Arabidopsis seeds were surface sterilized for 15 min with ethanol 70%, rinsed with ethanol 95% and completely dried before used. Sterilized seeds were plated onto ½ MS agar medium (Murashige and Skoog 2,2 g/L, MES 0,5 g/L, agar plant 1 % (w/v), adjusted to pH 5.8) and stratified 48hr at 4°C in the dark. Seedlings were grown under 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ photosynthetic flux at 22°C and 16h light / 8h dark cycles. Those growth conditions were systematically used, unless otherwise indicated.

Genes cloning, mutagenesis, plasmids construction.

For the construction of transgenic complemented line of *grxs17* mutant and production of recombinant proteins, cDNA of GRXS17 (At4g04950) were inserted into the pGEM-T Easy plasmid (Promega, Madison, WI, USA). Different point mutations of cysteines to serines in GRXS17 were generated using QuikChange II Directed Mutagenesis Kit (Agilent) using primers detailed in Table 1: GRXS17-C33S (GRXS17-m1), GRXS17-C179S/C309S/C416S (GRXS17-m234) and GRXS17-C33S/C179S/C309S/C416S (GRXS17-m1234).

To generate complemented lines, *GRXS17*, *GRXS17-C33S* and *GRXS17-C33S/C179S/C309S/C416S* genes were cloned in the pCAMBIA1302 (*Pr35S:gene:GFP*) vector. To perform immunoprecipitation, *GRXS17* was cloned in a modified pCAMBIA 1300 vector harboring a Flag-Flag-HA-HA sequence fused to the C-terminal end of the protein (*Pr35S:gene:Flag/Flag/HA/HA*)

For recombinant proteins production, GRXS17, GRXS17-C33S, GRXS17-C179/309/416S, GRXS17-C33/179/309/416S and the cytosolic malate dehydrogenase1 (cytMDH1) from *Arabidopsis thaliana* (At1g04410) were cloned in the pET16b vector (Novagen; Merck Biosciences) using primers detailed in Table 1.

Plants transformation

Plasmids were transferred into *Arabidopsis* via *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 using methods described (Clough & Bent, 1998). Transformants were selected on ½ MS medium plates containing 50 µg ml⁻¹ hygromycin and checked by PCR using appropriate primers (Table EV2).

Production and purification of recombinant proteins

All proteins were produced by induction in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Cultures of 2 L of an ampicillin-resistant ($100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) colony were grown at 37°C and induced by $100 \mu\text{M}$ isopropyl- β -D-galactopyranoside (IPTG) in the exponential phase ($\text{DO}=0.5$). Bacteria were harvested by centrifugation 3h after induction and stored at -80°C before protein extraction. Pellets were resuspended in buffer (Tris-HCl 50mM pH 7.0, NaCl 100 mM and 1 tablet anti-protease cocktail (Roche) for 25 mL), extracted using a cell disrupter (Constant Systems Limited, Northants, UK) and purified with a commercial kit according to manufacturer instructions (His-bind buffer kit, Millipore).

Holdase activity and foldase activity

The holdase chaperone was measured by using the cytosolic MDH1 (cytMDH1) from *Arabidopsis thaliana* (Huang *et al*, 2018) or the citrate synthase (CS) from porcine heart (Sigma-Aldrich) at respectively 55° or 43°C according to (Lee *et al*, 2009). The foldase chaperone was examined by using glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) (Sigma-Aldrich) according to Lee *et al.*, 2009. Light scattering (holdase) or absorption (foldase) was monitored with a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer at 340 nm (Shimadzu, Japan) equipped with a thermostatic cell holder.

Microscopy

Confocal microscopic observations were carried out using the Axio observer Z1 microscope with the LSM 700 scanning module, the ZEN 2010 software (Zeiss) and the DAPI (BP 420-480) and Alexa 488 (BP 490-555) filters.

Size-exclusion chromatography

All experiments have been realized using an ÄKTA fast protein liquid chromatography (FPLC) system (Amersham Biosciences, Sweden) at 10°C. The absorbance was monitored at 280 nm. The column was calibrated using blue dextran (>2,000 kDa), thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumin (75 kDa) and ovalbumin (44 kDa). For recombinant protein of GRXS17 (wild form and mutated forms), a Superose 6 column has been used, equilibrated with a 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer containing 150 mM NaCl and 5 mM MgCl₂ at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. All recombinant proteins samples were dialysed before injection. For reductant conditions, samples were reduced with 100mM of DTT before injection, dialyzed and analyzed with previously defined buffer supplemented with 5mM of DTT to maintain proteins under reduced state.

For total proteins extract from plant, a HiPrep column Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare Life Sciences) has been used, equilibrated with a 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer containing 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol and 0.1% NP40 at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. Samples were extracted in the same buffer added to 10 µM of MG132 and anti-protease cocktail (Roche) at a concentration of 1 tablet to 10 mL. Extraction is realized with a ratio of 1 g of plant powder in 2 volumes of buffer.

Protein gel and immunoblot

Precasted SDS-PAGE or native gels were used according to the manufacturer instructions (Biorad). For immunoblot analysis, gels were transferred to nitrocellulose membranes. Rabbit polyclonal antibodies against GRXS17 (1:25000) was used for protein gel blotting. Goat anti-rabbit antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1:10 000) was used as secondary antibodies and revealed with enhanced chemiluminescence reagents (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore). GRXS17 sulfenylation was analyzed according to Huang *et al* (2018).

Thermotolerance assays

For the thermotolerance assays, we applied three different protocols: LAT (Long-Term Acquired Thermotolerance), SAT (Short-term Acquired Thermotolerance) and TMHT (Thermotolerance to Moderately High Temperatures) as defined by (Yeh *et al*, 2012). The seeds germinated and grown in horizontal plates containing medium MS (Murashige and Skoog 4,4 g/L, sucrose 1% (w/v), regulated at pH 5.8). The percentage of viability has been calculated from survivor after the recovery period, survivor being the plants having recover leaf growth.

Immunoprecipitation

Proteins from plants expressing the *Pr35S:GRXS17-Flag/HA* or the *Pr35S:GRXS17* constructs were used for immunoprecipitation experiments. The seeds were germinated and grown in vertical plates containing medium ½ MS during 14 days at 20°C and treated or not 2 h at 35°C. The proteins were extracted and submitted to immunoprecipitation. Agarose beads with covalently attached anti-Flag antibody were used according to manufacturer instructions and eluted with a solution of glycine 0.1 M pH 2.5. In another set of experiments, proteins extracts were first submitted to size exclusion chromatography as described previously. Fractions 18-21 corresponding to oligomers and 22-25 to dimers for plants grown at 20°C and fractions 16-19 and 22-26 for plants treated 2 h at 35°C (see Figure 2) were collected and submitted to immunoprecipitation.

Chemicals and enzymes

Proteomics grade Trypsin and ProteaseMax surfactant were purchased from Promega (Charbonnières, France). Reversed phase C18 spin columns, precolumns and analytical columns were all obtained from Thermo Scientific (Les Ulis, France). Solvents and ion-pairing agents were certified

LC-MS grade and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) with the highest purity available.

Sample preparation

Immunoprecipitated samples were reduced in the presence of 0.02% (v/v) ProteaseMax using 5 mM dithiotreitol for 20 min at 40°C. Free cysteines were further carbamidomethylated by adding 11 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature in the dark. Proteins were digested overnight at 35°C with modified porcine trypsin in a 1:50 (w/w) enzyme:substrate ratio. The digestion was stopped by addition of 0.1% trifluoroacetic acid and peptide mixtures were centrifuged for 10 min at 21,500 x g, 4°C. Tryptic peptides present in supernatants were then subjected to desalting using reversed phase C18 spin columns as recommended by the supplier. After elution, desalted peptides were concentrated with a SpeedVac (Eppendorf) and prepared in 3% acetonitrile (CAN), 0.1% formic acid (FA) (solvent A) at a final concentration of 0.27 µg/µL based on the initial protein concentration.

Mass spectrometry

Peptide mixtures were analyzed on a Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) coupled to a Proxeon Easy nLC 1000 reversed phase chromatography system (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) using a binary solvent system consisting of solvent A and solvent B (0.1% FA in ACN). 3 µL (800 ng) of tryptic digests were loaded on an Acclaim Pepmap C18 precolumn (2 cm x 75 µm i.d., 2 µm, 100 Å) equilibrated in solvent A and peptides were separated on an Acclaim Pepmap C18 analytical column (25 cm x 75 µm i.d., 2 µm, 100 Å) at a constant flow rate of 250 nL/min by two successive linear gradients of solvent B from 0% to 25% in 100 min, from 25% to 40% in 20 min and then up to 85% in 2 min followed by an isocratic step at 85% for 7 min. The instrument was operated in positive and data-dependent acquisition modes with survey scans

acquired at a resolution of 70,000 (at m/z 200 Da) with a mass range of m/z 375-1,400. After each full-scan MS, up to 10 of the most intense precursor ions (except +1, +5 to +8 and unassigned charge state ions) were fragmented in the HCD cell (normalized collision energy fixed at 27) and then dynamically excluded for 60 s. AGC target was fixed to 3×10^6 ions in MS and 10^5 ions in MS/MS with a maximum ion accumulation time set to 100 ms for MS and MS/MS acquisitions. All other parameters were set as follows: capillary temperature, 250°C; S-lens RF level, 60; isolation window, 2 Da. Acquisitions were performed with Excalibur software (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) and to improve mass accuracy of full-scan MS spectra, a permanent recalibration of the instrument was allowed using polycyclodimethylsiloxane ((C₂H₆SiO)₆, m/z 445.12003 Da) as lock mass.

Proteomic data processing

MS raw data of HMW complexes were processed with ProteomeDiscoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) and searched against the UniprotKB *Arabidopsis thaliana* database (25/10/2015; 31480 entries) combined with a database of classical contaminants using an in-house Mascot search server (Matrix Science, London, UK; version 2.4). Mass tolerance was set to 10 ppm for the parent ion mass and 20 mmu for fragments and up to two missed cleavages per tryptic peptide were allowed. Methionine oxidation, deamidation of asparagine and N-terminal acetylation were taken into account as variable modifications and cysteine carbamidomethylation as fixed modification. Peptide and protein False Discovery Rates (FDRs) were determined by searching against a reversed decoy database. Peptide identifications were filtered at 1% FDR using the Percolator node. Proteins were filtered at 1% FDR and reverse and contaminants proteins were removed.

MS raw data were processed with MaxQuant software (version 1.6.0.13) and with the associated Andromeda search engine using the UniprotKB *Arabidopsis thaliana* database (25/10/2015; 31480 entries) combined with the Maxquant database of common contaminants. First and main searches were performed with precursor mass tolerances of 20 and 4.5 ppm, respectively. The minimum peptide length was set to seven amino acids and specificity for protein digestion was restricted to trypsin/P cleavage with a maximum of two missed cleavages per peptides. Methionine oxidation and N-terminal acetylation were specified as variable modifications, carbamidomethylation of cysteines was specified as fixed modification. The peptide and protein false discovery rate (FDR) was set to 1%. To increase protein identification, a match between runs was systematically performed (Match time window 0.7 min; alignment time window: 20 min) and for label-free quantification of immunoprecipitated proteins, the LFQ algorithm and normalization were chosen and unique and razor peptides were used.

MaxQuant output was further processed and analyzed using Perseus software (version 1.6.07). Protein quantification was performed using the ProteinGroups.txt file after removing of reverse and contaminant proteins and Log2 transformation of quantitative data. Proteins showing at least 2 unique and razor peptides and having quantitative data in at least 3 biological replicates were considered for statistical analysis of each temperature condition using a Benjamini-Hochberg-corrected Student T-test. Proteins showing a FDR < 0.05 were considered significantly enriched. For both temperature conditions, proteins having quantitative data in biological samples expressing the tagged GRXS17 but not in the five corresponding control samples were treated separately. In this case, only proteins showing quantitative data in three out of the five biological replicates with at least 2 unique and razor peptides from samples expressing tagged GRXS17 were considered as significant.

Circular Dichroism

In preparation for CD analysis, samples of GrxS17 were buffer-exchanged into 20 mM sodium phosphate, 100 mM NaF, pH 7.3, using Bio-Spin® 6 columns, adjusted to 4 μ M, and treated with 400 μ M of either TCEP or H₂O₂ for 1 hr at 25°C. Samples were centrifuged and vacuum-degassed for 10 min prior to analysis by CD. CD spectra were collected at 20°C using a J-715 spectropolarimeter (JASCO) with a 0.1 mm path-length cuvette, from a range of 250-185 nm in 1.0 nm sampling and spectrum averaged over 8 repeats. The spectra of the buffer alone with TCEP/H₂O₂ was subtracted prior to conversion of data to units of mean residue ellipticity. Secondary structure content was estimated using the online server, BeStSel (Micsonai *et al*, 2015). For monitoring change in secondary structure over time, CD spectra of 250-190 nm were collected at 100 nm min⁻¹. The secondary structure change of GrxS17 following addition of a 100-fold excess of H₂O₂ was measured as the change in $[\theta]$ at 222 nm over a course of 65 mins, spectra collected every 41 s. In Prism (GraphPad) a one phase decay model was fitted to this data, and a rate of conformational change determined.

Acknowledgments

The authors would like to thank Marion Hamon for technical assistance for mass spectrometry analyses. This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique, by the Agence Nationale de la Recherche ANR-Blanc Cynthiol 12-BSV6-0011, by LABEX DYNAMO ANR-LABX-011 and EQUIPEX CACSICE ANR-11-EQPX-0008, notably through funding of the Proteomic Platform of IBPC (PPI). Laura Martins was supported by a PhD grant from the Université de Perpignan Via Domitia (Ecole Doctorale Energie et Environnement ED305). Work performed in the lab of Joris Messens was supported by the Research Foundation-Flanders Excellence of Science project no. 30829584, the Research Foundation-Flanders grants no. G0D7914N, and the VUB

Strategic Research Programme (SRP34). We gratefully acknowledge the Core Facilities of Protein Spectroscopy and Protein Biochemistry of Philipps-Universität Marburg. Work performed in the lab of Renate Scheibe was supported with funds from the DFG (SCHE 217; SPP 1710).

Author contributions

LM, JK, JSV, SDL, RL, JM, RS, JPR and CR designed research; LM, LB, SAF, CHM, DY, NHTD, WV and AD performed research; SAF, CHM, DY, NHTD, SDL, RL and JM contributed new reagents/analytic tools; LM, JK, SAF, CHM, DY, JSV, SDL, RL, JM, RS, JPR and CR analyzed data; and LM, JK, SAF, DY, JSV, SDL, RL, JM, RS, JPR and CR wrote the paper.

Author contributions

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ali Khan H & Mutus B (2014) Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Front. Chem.* **2**: 70
- Bandyopadhyay S, Gama F, Molina-Navarro MM, Gualberto JM, Claxton R, Naik SG, Huynh BH, Herrero E, Jacquot JP, Johnson MK & Rouhier N (2008) Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J.* **27**: 1122–1133
- Begas P, Liedgens L, Moseler A, Meyer AJ & Deponte M (2017) Glutaredoxin catalysis requires two distinct glutathione interaction sites. *Nat. Commun.* **8**: 14835
- Berndt C, Hudemann C, Hanschmann E-M, Axelsson R, Holmgren A & Lillig CH (2007) How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2? *Antioxid. Redox Signal.* **9**: 151–157
- Berndt C & Lillig CH (2017) Glutathione, Glutaredoxins, and Iron. *Antioxid. Redox Signal.* **27**: 1235–1251
- Chae HB, Moon JC, Shin MR, Chi YH, Jung YJ, Lee SY, Nawkar GM, Jung HS, Hyun JK, Kim WY, Kang CH, Yun D-J, Lee KO & Lee SY (2013) Thioredoxin reductase type C (NTRC) orchestrates enhanced thermotolerance to Arabidopsis by its redox-dependent holdase chaperone function. *Mol. Plant* **6**: 323–336
- Cheng N-H, Liu J-Z, Liu X, Wu Q, Thompson SM, Lin J, Chang J, Whitham SA, Park S, Cohen JD & Hirschi KD (2011) Arabidopsis monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, is critical for temperature-dependent postembryonic growth and development via modulating auxin response. *J. Biol. Chem.* **286**: 20398–20406
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E & Mittler R (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J.* **90**: 856–867
- Clough SJ & Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **16**: 735–743
- Couturier J, Jacquot J-P & Rouhier N (2009) Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **66**: 2539–2557
- Couturier J, Ströher E, Albetel A-N, Roret T, Muthuramalingam M, Tarrago L, Seidel T, Tsan P, Jacquot J-P, Johnson MK, Dietz K-J, Didierjean C & Rouhier N (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
- Couturier J, Wu H-C, Dhalleine T, Pégeot H, Sudre D, Gualberto JM, Jacquot J-P, Gaymard F, Vignols F & Rouhier N (2014) Monothiol glutaredoxin-BolA interactions: redox control of Arabidopsis thaliana BolA2 and SufE1. *Mol. Plant* **7**: 187–205
- Dickinson PJ, Kumar M, Martinho C, Yoo SJ, Lan H, Artavanis G, Charoensawan V, Schöttler MA, Bock R, Jaeger KE & Wigge PA (2018) Chloroplast Signaling Gates Thermotolerance in Arabidopsis. *Cell Rep.* **22**: 1657–1665

- Encinar del Dedo J, Gabrielli N, Carmona M, Ayté J & Hidalgo E (2015) A cascade of iron-containing proteins governs the genetic iron starvation response to promote iron uptake and inhibit iron storage in fission yeast. *PLoS Genet.* **11**: e1005106
- Goemans CV, Vertommen D, Agrebi R & Collet J-F (2018) CnoX Is a Chaperedoxin: A Holdase that Protects Its Substrates from Irreversible Oxidation. *Mol. Cell* **70**: 614-627.e7
- Hartl FU, Bracher A & Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**: 324–332
- Hu Y, Wu Q, Peng Z, Sprague SA, Wang W, Park J, Akhunov E, Jagadish KSV, Nakata PA, Cheng N, Hirschi KD, White FF & Park S (2017) Silencing of OsGRXS17 in rice improves drought stress tolerance by modulating ROS accumulation and stomatal closure. *Sci. Rep.* **7**: 15950
- Huang J, Niazi AK, Young D, Rosado LA, Vertommen D, Bodra N, Abdelgawwad MR, Vignols F, Wei B, Wahni K, Bashandy T, Bariat L, Van Breusegem F, Messens J & Reichheld J-P (2018) Self-protection of cytosolic malate dehydrogenase against oxidative stress in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **69**: 3491–3505
- Iñigo S, Durand AN, Ritter A, Le Gall S, Termathe M, Klassen R, Tohge T, De Coninck B, Van Leene J, De Clercq R, Cammue BPA, Fernie AR, Gevaert K, De Jaeger G, Leidel SA, Schaffrath R, Van Lijsebettens M, Pauwels L & Goossens A (2016) Glutaredoxin GRXS17 Associates with the Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly Pathway. *Plant Physiol.* **172**: 858–873
- Jakob U, Eser M & Bardwell JC (2000) Redox switch of hsp33 has a novel zinc-binding motif. *J. Biol. Chem.* **275**: 38302–38310
- Jakob U, Muse W, Eser M & Bardwell JC (1999) Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96**: 341–352
- Klinge S, Hirst J, Maman JD, Krude T & Pellegrini L (2007) An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**: 875–877
- Knuesting J, Riondet C, Maria C, Kruse I, Bécuwe N, König N, Berndt C, Tourrette S, Guilleminot-Montoya J, Herrero E, Gaymard F, Balk J, Belli G, Scheibe R, Reichheld J-P, Rouhier N & Rey P (2015) Arabidopsis glutaredoxin S17 and its partner, the nuclear factor Y subunit C11/negative cofactor 2 α , contribute to maintenance of the shoot apical meristem under long-day photoperiod. *Plant Physiol.* **167**: 1643–1658
- Lee JR, Lee SS, Jang HH, Lee YM, Park JH, Park S-C, Moon JC, Park SK, Kim SY, Lee SY, Chae HB, Jung YJ, Kim WY, Shin MR, Cheong G-W, Kim MG, Kang KR, Lee KO, Yun D-J & Lee SY (2009) Heat-shock dependent oligomeric status alters the function of a plant-specific thioredoxin-like protein, AtTDX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 5978–5983
- Liebthal M, Maynard D & Dietz K-J (2018) Peroxiredoxins and Redox Signaling in Plants. *Antioxid. Redox Signal.* **28**: 609–624
- Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831–838

- Lillig CH, Berndt C, Vergnolle O, Lönn ME, Hudemann C, Bill E & Holmgren A (2005) Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 8168–8173
- Mayer MP (2010) Gymnastics of molecular chaperones. *Mol. Cell* **39**: 321–331
- Meyer Y, Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld J-P & Riondet C (2012) Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxid. Redox Signal.* **17**: 1124–1160
- Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F & Reichheld J-P (2009) Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu. Rev. Genet.* **43**: 335–367
- Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee Y-H, Goto Y, Réfrégiers M & Kardos J (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: E3095-3103
- Moseler A, Aller I, Wagner S, Nietzel T, Przybyla-Toscano J, Mühlhoff U, Lill R, Berndt C, Rouhier N, Schwarzländer M & Meyer AJ (2015) The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron-sulfur protein maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 13735–13740
- Park SK, Jung YJ, Lee JR, Lee YM, Jang HH, Lee SS, Park JH, Kim SY, Moon JC, Lee SY, Chae HB, Shin MR, Jung JH, Kim MG, Kim WY, Yun D-J, Lee KO & Lee SY (2009) Heat-shock and redox-dependent functional switching of an h-type *Arabidopsis* thioredoxin from a disulfide reductase to a molecular chaperone. *Plant Physiol.* **150**: 552–561
- Park S-W, Li W, Viehhauser A, He B, Kim S, Nilsson AK, Andersson MX, Kittle JD, Ambavaram MMR, Luan S, Esker AR, Tholl D, Cimini D, Ellerström M, Coaker G, Mitchell TK, Pereira A, Dietz K-J & Lawrence CB (2013) Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 9559–9564
- Riondet C, Desouris JP, Montoya JG, Chartier Y, Meyer Y & 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
- Rouhier N, Lemaire SD & Jacquot J-P (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 143–166
- Rouhier N, Unno H, Bandyopadhyay S, Masip L, Kim S-K, Hirasawa M, Gualberto JM, Lattard V, Kusunoki M, Knaff DB, Georgiou G, Hase T, Johnson MK & Jacquot J-P (2007) Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 7379–7384
- Schwarzländer M, Fricker MD, Müller C, Marty L, Brach T, Novak J, Sweetlove LJ, Hell R & Meyer AJ (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J. Microsc.* **231**: 299–316
- Ströher E, Grassl J, Carrie C, Fenske R, Whelan J & Millar AH (2016) Glutaredoxin S15 Is Involved in Fe-S Cluster Transfer in Mitochondria Influencing Lipoic Acid-Dependent

- Enzymes, Plant Growth, and Arsenic Tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **170**: 1284–1299
- Stull F, Koldewey P, Humes JR, Radford SE & Bardwell JCA (2016) Substrate protein folds while it is bound to the ATP-independent chaperone Spy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**: 53–58
- Voth W, Schick M, Gates S, Li S, Vilardi F, Gostimskaya I, Southworth DR, Schwappach B & Jakob U (2014) The protein targeting factor Get3 functions as ATP-independent chaperone under oxidative stress conditions. *Mol. Cell* **56**: 116–127
- Waszczak C, Akter S, Eeckhout D, Persiau G, Wahni K, Bodra N, Van Molle I, De Smet B, Vertommen D, Gevaert K, De Jaeger G, Van Montagu M, Messens J & Van Breusegem F (2014) Sulfenome mining in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 11545–11550
- Wingert RA, Galloway JL, Barut B, Foott H, Fraenkel P, Axe JL, Weber GJ, Dooley K, Davidson AJ, Schmid B, Schmidt B, Paw BH, Shaw GC, Kingsley P, Palis J, Schubert H, Chen O, Kaplan J, Zon LI & Tübingen 2000 Screen Consortium (2005) Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* **436**: 1035–1039
- Winter J, Ilbert M, Graf PCF, Ozcelik D & Jakob U (2008) Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* **135**: 691–701
- Wu Q, Hu Y, Sprague SA, Kakeshpour T, Park J, Nakata PA, Cheng N, Hirschi KD, White FF & Park S (2017) Expression of a monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, in tomato (*Solanum lycopersicum*) enhances drought tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **491**: 1034–1039
- Wu Q, Lin J, Liu J-Z, Wang X, Lim W, Oh M, Park J, Rajashekar CB, Whitham SA, Cheng N-H, Hirschi KD & Park S (2012) Ectopic expression of Arabidopsis glutaredoxin AtGRXS17 enhances thermotolerance in tomato. *Plant Biotechnol. J.* **10**: 945–955
- Yeh C-H, Kaplinsky NJ, Hu C & Charng Y-Y (2012) Some like it hot, some like it warm: phenotyping to explore thermotolerance diversity. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **195**: 10–23
- Zaffagnini M, Michelet L, Massot V, Trost P & Lemaire SD (2008) Biochemical characterization of glutaredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii* reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* **283**: 8868–8876

SUPPORTING INFORMATIONS

Table EV2: Primers used in this study

Primer name	Primer sequence	Experiment purpose
S17-NdeI-5'	GTCATATGAGCGGTACGGTGAAGGATATCG	Cloning GRXS17 in Pet16b
S17-BamH1-3'	CGGGATCCTCATTACTCGGATAGAGTTGCTTTGAG	Cloning GRXS17 in pET16b
mdh1-53	AGGATGTGATGTCCAAGAATG	Cloning MDH in pEt16b
mdh1-35	CTCTACAGTTCAACAACGTGG	Cloning MDH in pET16b
S17-1234-NcoI-F	CGCCATGGTCGGTACGGTGAAGGATATCGTTTC	Cloning GRXS17 in pCAMBIA 1302
S17-1234-speI-R	CGACTAGTCTCGGATAGAGTTGCTTTGAG	Cloning GRXS17 in pCAMBIA 1302
S17-1CS-F	TTCTGGGCTTCTTGGTCTGATGCTTCGAAGCAG	Point mutagenesis of GRXS17-C33S
S17-1CS-R	CTGCTTCGAAGCATCAGACCAAGAAGCCAGAA	Point mutagenesis of GRXS17-C33S
S17-2CS-F	GAAGAGCCTAGGTCTGGGTTTAGCAGG	Point mutagenesis of GRXS17-C179S
S17-2CS-R	CCTGCTAAACCCAGACCTAGGCTCTTC	Point mutagenesis of GRXS17-C179S
S17-3CS-F	GAAGAACCAAAGTCTGGGTTTCAGTGGG	Point mutagenesis of GRXS17-C309S
S17-3CS-R	CCCCTGAACCCAGACTTTGGTTCTTC	Point mutagenesis of GRXS17-C309S
S17-4CS-F	GATGAACCGAAATCCGGATTTAGCTCC	Point mutagenesis of GRXS17-C416S
S17-4CS-R	GGAGCTAAATCCGGATTTCCGGTTCATC	Point mutagenesis of GRXS17-C416S
NewGRXS17-5'	GGCGCACCAGTCGTGCTTCA	Checking transformed plants
NewGRXS17-3'	GCAGCAGGCTCCGCAGATGT	Checking transformed plants

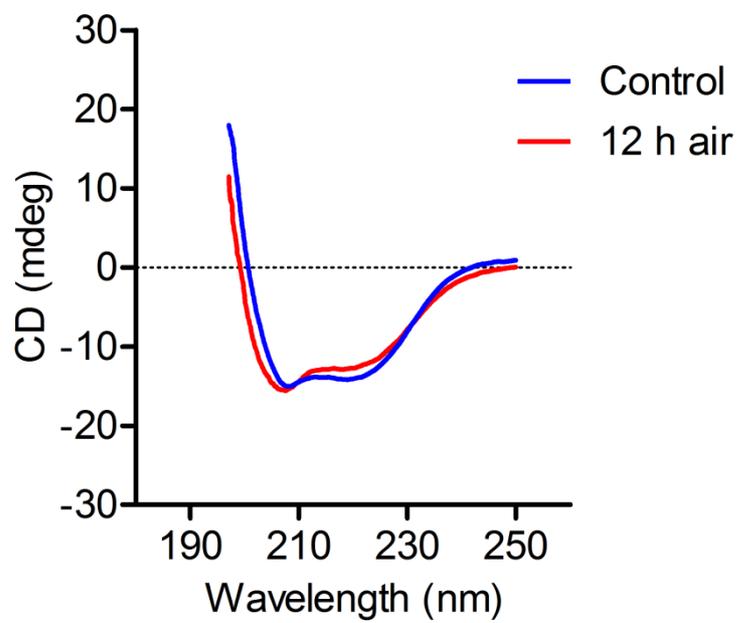


Figure EV1: UV-CD spectra of holoGRXS17 (Control, blue) and after 12 h air treatment (12 h air, red) GRXS17. Air treatment does not induce major changes in the CD-spectrum of GRXS17

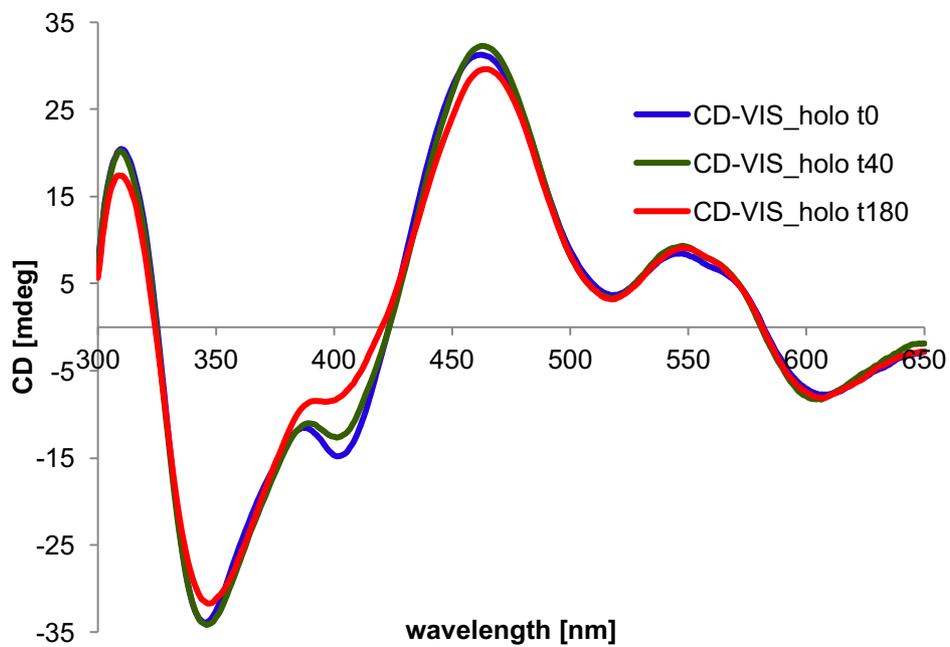


Figure EV2: Cluster stability at 30°C. Visible circular dichroism (CD) spectra of reconstituted holo-GRXS17 at room temperature (blue) or subjected to 30°C for 40 min (green) or 180 min (red) .

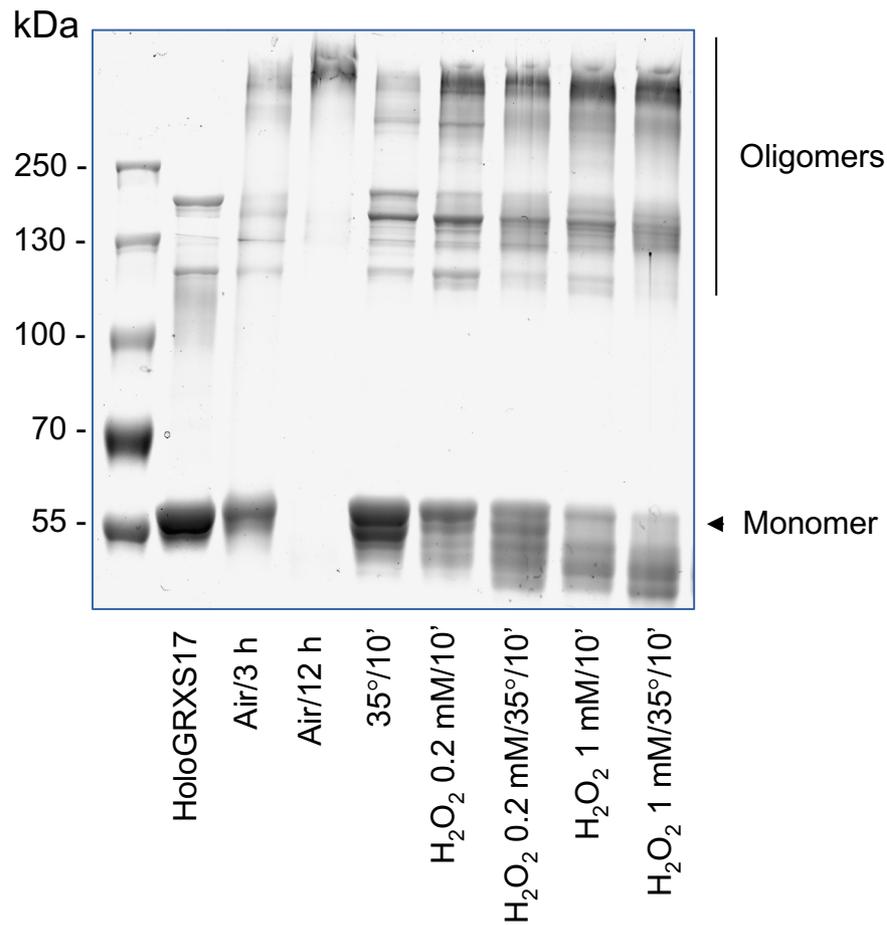


Figure EV3: Effect of H₂O₂ on GRXS17 oligomerization. 5 µg recombinant holoGRXS17 were oxidized in air or with a combination of heat (35°C) or/and H₂O₂ treatments for the indicated times. Samples were subjected to non-reducing SDS-PAGE and proteins revealed by Coomassie blue staining.

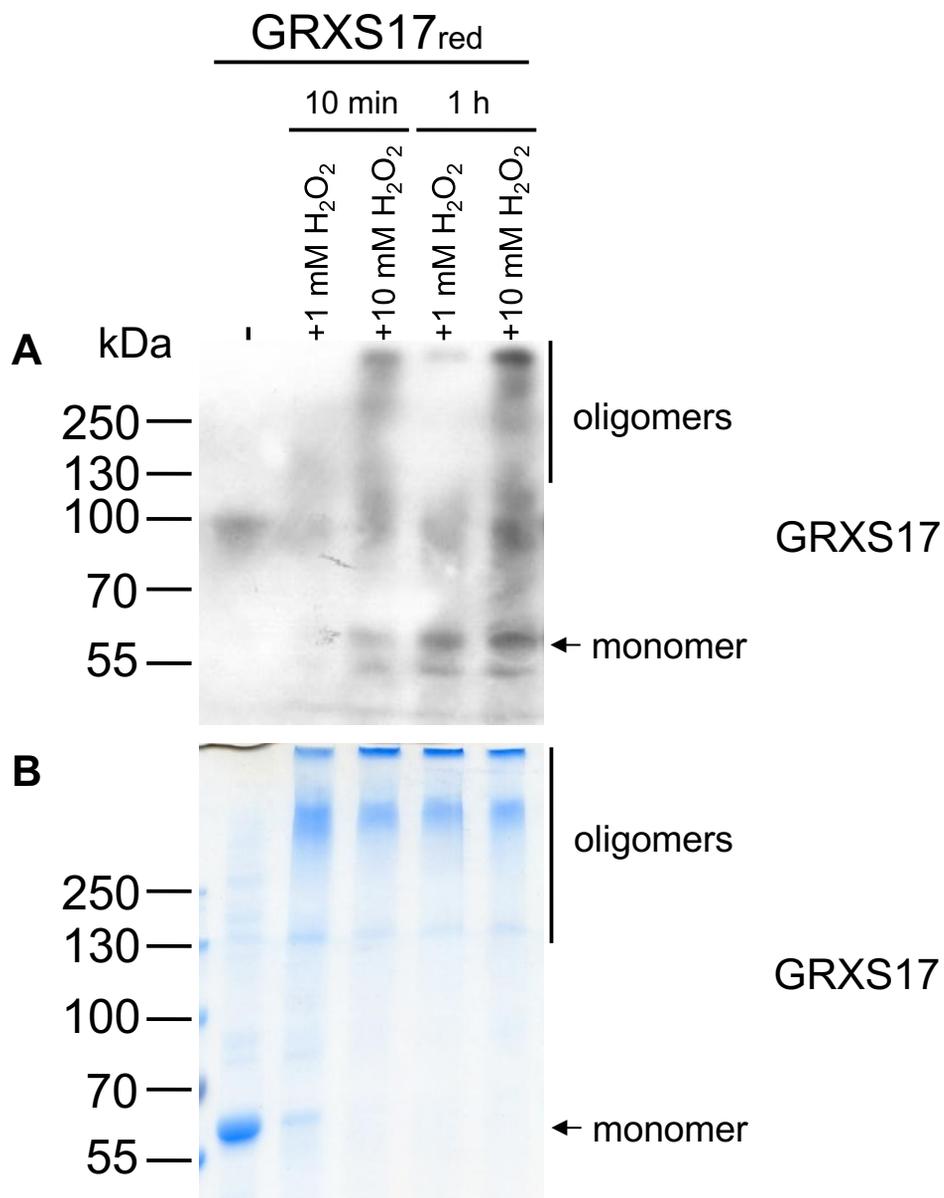


Figure EV4: GRXS17 is sulfenylated upon H₂O₂ treatment. Reduced GRXS17 treated with H₂O₂ is sulfenylated *in vitro* and oligomerizes via intermolecular disulfide bonds. DTT-reduced GRXS17 (GRXS17_{red}, 8 μM) was incubated without or with 1 or 10 mM H₂O₂ in the presence of 2 mM dithiothreitol. Samples were analyzed by SDS-PAGE. GRXS17-SOH₂ formation was analyzed by immunoblot with an anti-cysteine sulfenic acid antibody (A). The same samples were also analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining (B).

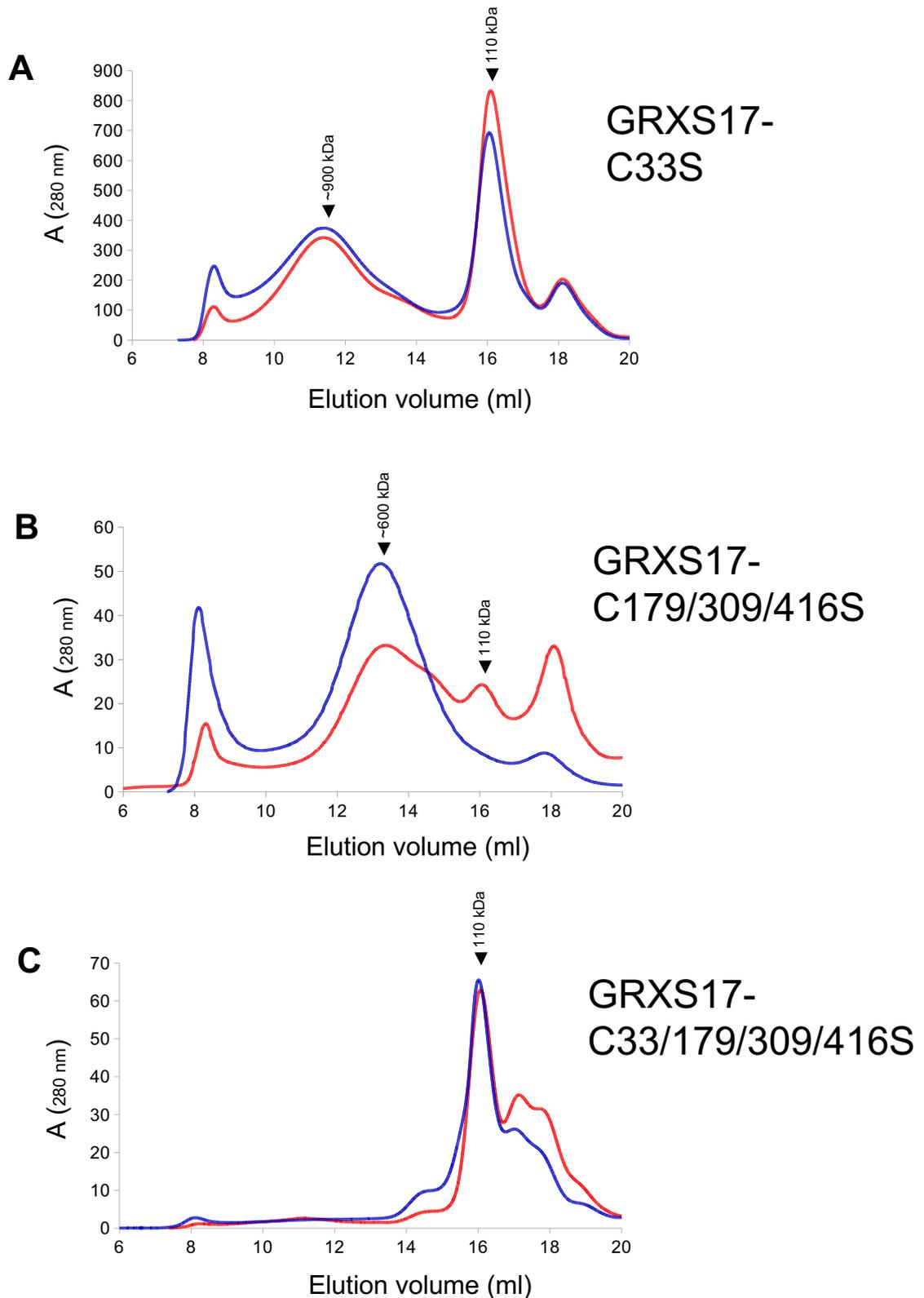


Figure EV5: Role of active-site cysteines on GRXS17 oligomerization. Oxidized GRXS17 forms an oligomer via intermolecular disulfide bonds involving active site Cys residues. Recombinant GRXS17 mutated on active site Cys were maintained in air and loaded on a gel filtration chromatography column (Superose 6) in presence (red) or absence of 10 mM DTT (blue). (A) GRXS17-C33S. (B) GRXS17-C179/309/416S. (C) GRXS17-C33/179/309/416S.

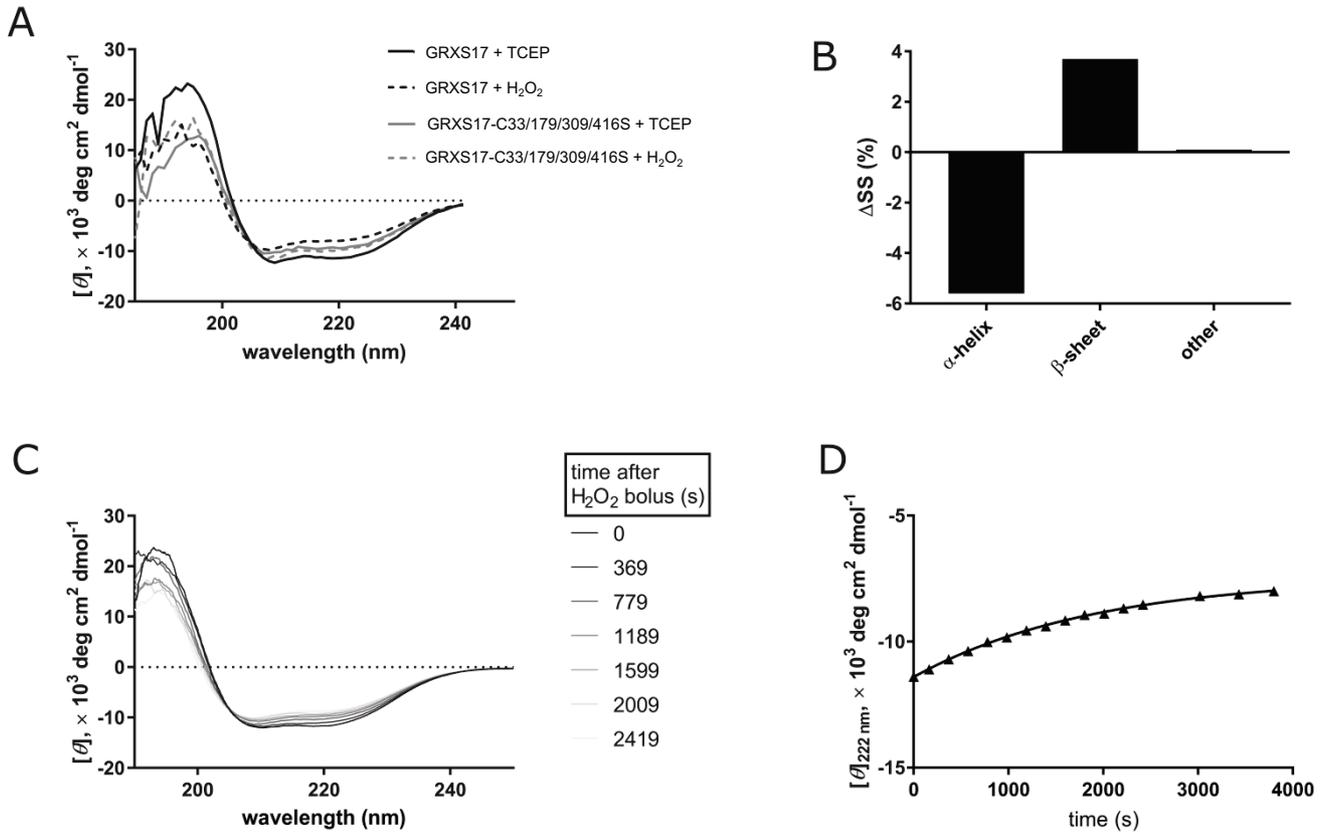


Figure EV6: CD study of redox-dependent structural changes in GrxS17. (A) H₂O₂ treatment induces a change in the CD-spectrum of wildtype (GRXS17), but not GRXS17-C33/179/309/416S relative to TCEP-treated sample. (B) Estimation of secondary structure content from the obtained CD spectra was performed in BeStSel (Micsonai et al., 2015), and the difference in structural content between the reduced and oxidized forms of GrxS17 determined. Panel B plots the subtraction of the TCEP-treated GrxS17 secondary structure composition from that of the H₂O₂-treated sample, thereby indicating the relative change in secondary structure content upon oxidation. Samples of GrxS17 were treated with TCEP or H₂O₂ at a molar ratio of 100:1 compound to protein. (C) Interval scans of CD-spectra of GRXS17 immediately following addition of H₂O₂ were recorded over time, revealing a time-dependent alteration in CD-spectra. (D) The change in [θ] at 222 nm from the spectra displayed in panel C was plotted in function of time, and a rate of secondary structure change determined by fitting to a one phase decay equation.

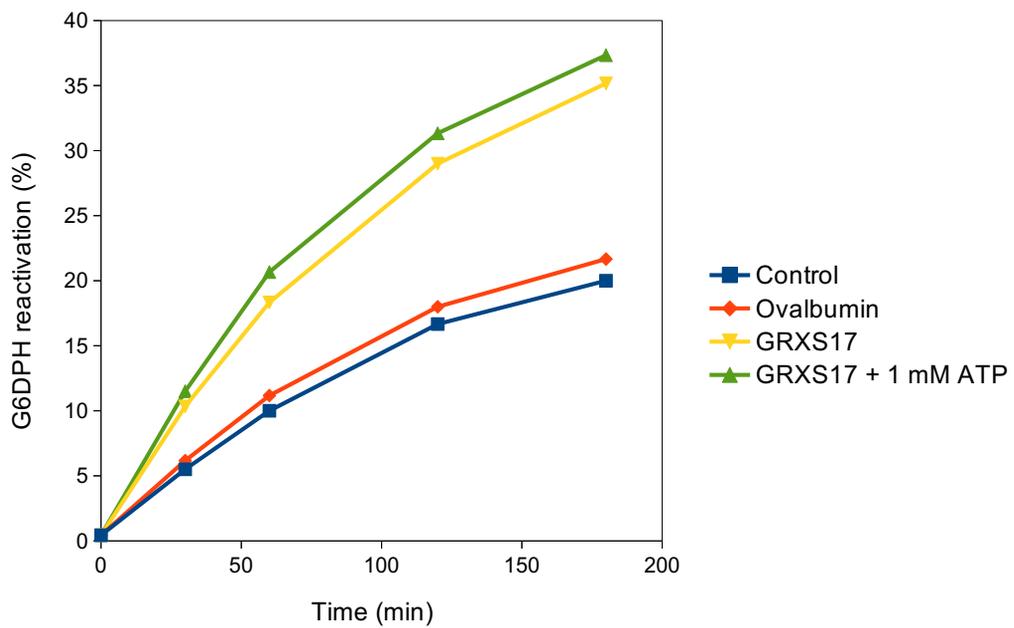


Figure EV7: GRXS17 foldase chaperone activity is independent of ATP. GRXS17 foldase activity was measured by reactivation of the Glucose-6 phosphate dehydrogenase (G6PDH) at 5:1 ratios at 30°C. GRXS17 (yellow) but not ovalbumin (red) reactivates G6PDH (dark blue). Addition of ATP (1 mM) to GRXS17 do not significantly modify the foldase activity. Data are representative of three independent experiments.

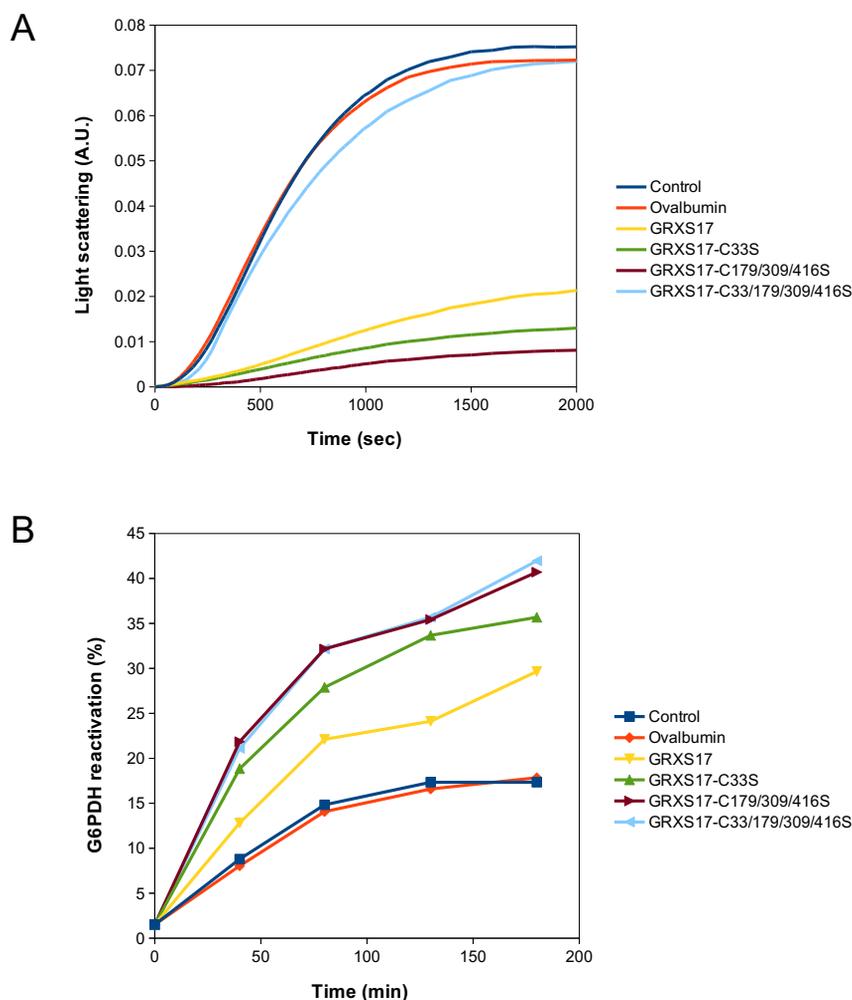


Figure EV8: Role of GRXS17 active site cysteines on holdase and foldase chaperone activities. (A) GRXS17 holdase activity towards cytMDH1 was measured by light scattering at 0.5:1 ratios at 55°C. GRXS17 (yellow) but not ovalbumin (red) protects cytMDH1 (dark blue) from temperature precipitation. GRXS17 point mutations in C33S (green) or C179/309/416S (dark red) do not alleviate holdase activity. However, C33/179/309/416S (light blue) mutations inhibit holdase activity. (B) GRXS17 foldase activity was measured by reactivation of the Glucose-6 phosphate dehydrogenase (G6PDH) at 5:1 ratios. GRXS17 (yellow) but not ovalbumin (red) reactivates G6PDH (dark blue). GRXS17 point mutations in C33S (green), C179/309/416S (dark red) and C33/179/309/416S (light blue) mutations do not alleviate foldase activity. Data are representative of three independent experiments.

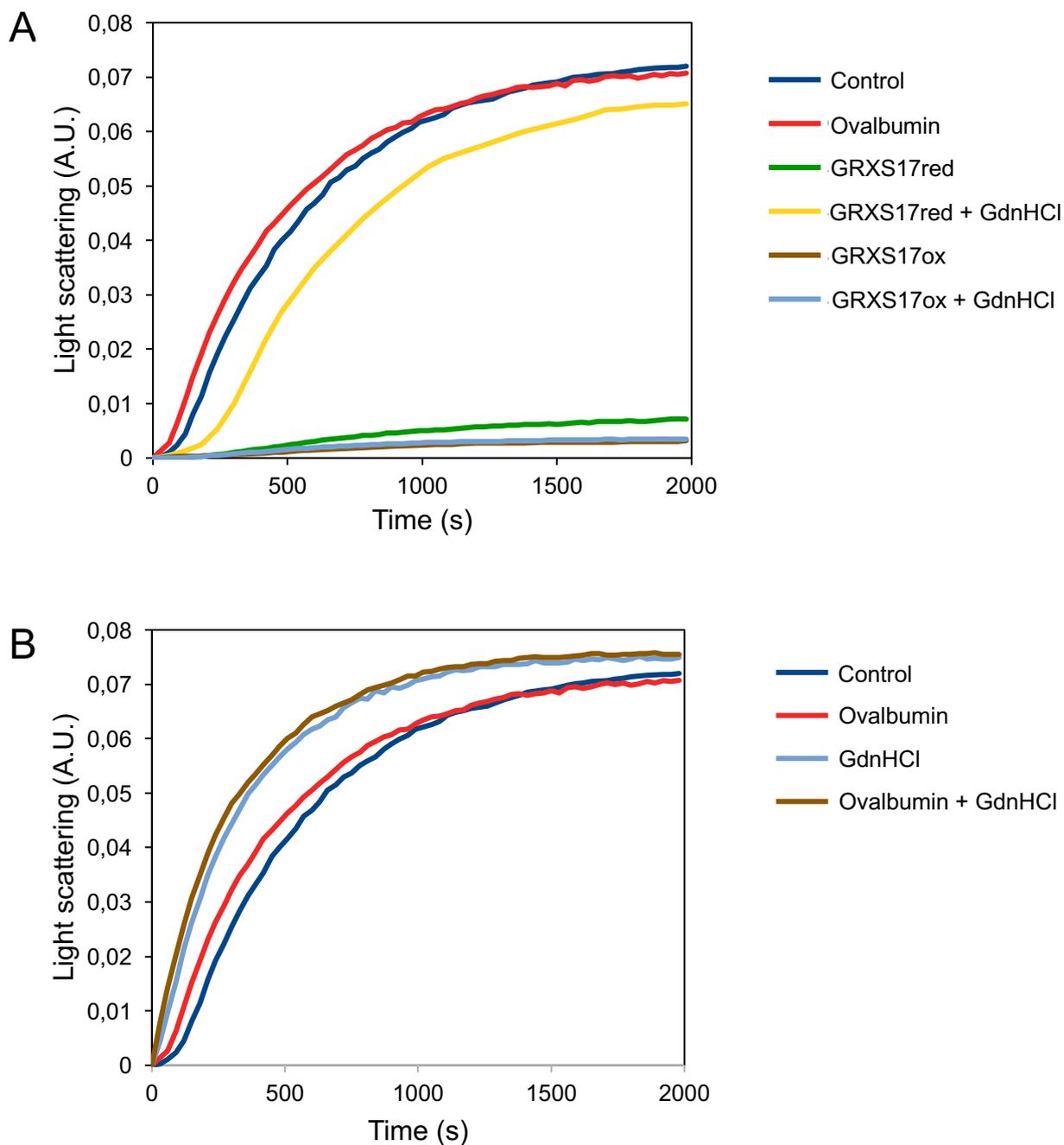


Figure EV9: GRXS17 oligomerization is required for holdase activity. (A) GRXS17 holdase activity towards cytMDH1 (Control) was measured by light scattering at 50°C. Reduced GRXS17 (GRXS17red in green, 5 mM DTT) and oxidized GRXS17 (GRXS17ox in red, 1 mM H₂O₂) protects cytMDH1 from temperature precipitation. Incubation of the same proteins with the chaotropic reagent guanidinium hydrochloride (GdnHCl, 20 mM) inhibits holdase activity in GRXS17red (yellow) but not in GRXS17ox (light blue). (B) Guanidinium hydrochloride (GdnHCl 20 mM) itself does not prevent cytMDH1 precipitation. Data are representative of three independent experiments.

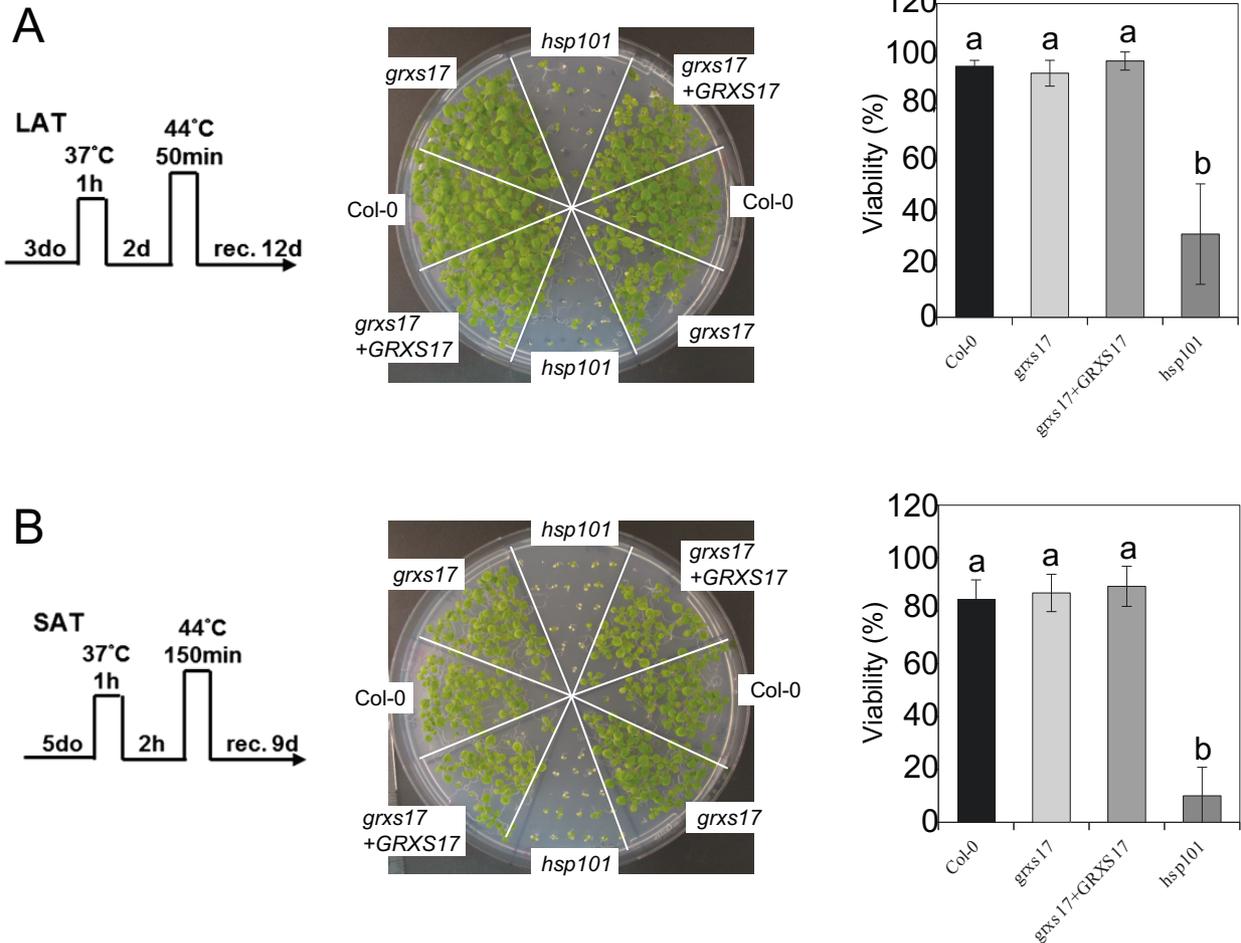


Figure EV10: GRXS17 involvement in heat stress regimes. *grxs17* mutant was subjected to different temperature stress regimes. (A) LAT, Long-term Acquired Thermotolerance; (B) SAT, Short-term Acquired Thermotolerance). Wild-type plants (Col-0), *grxs17* knock-out mutant (*grxs17*), *grxs17* mutant complemented with a Pr35S:GRXS17:GFP construct expressing the GRXS17:GFP fusion protein (+GRXS17), Heat-Shock Protein 101 knock-out mutant (*hsp101*). do: days old. rec: recovery. Data are means of 4-10 biological repetitions +/- SE, n = 20-25. The letters a and b indicate a significance of $p > 0.1$ and $p < 0.00001$ respectively by the Student's t-test.

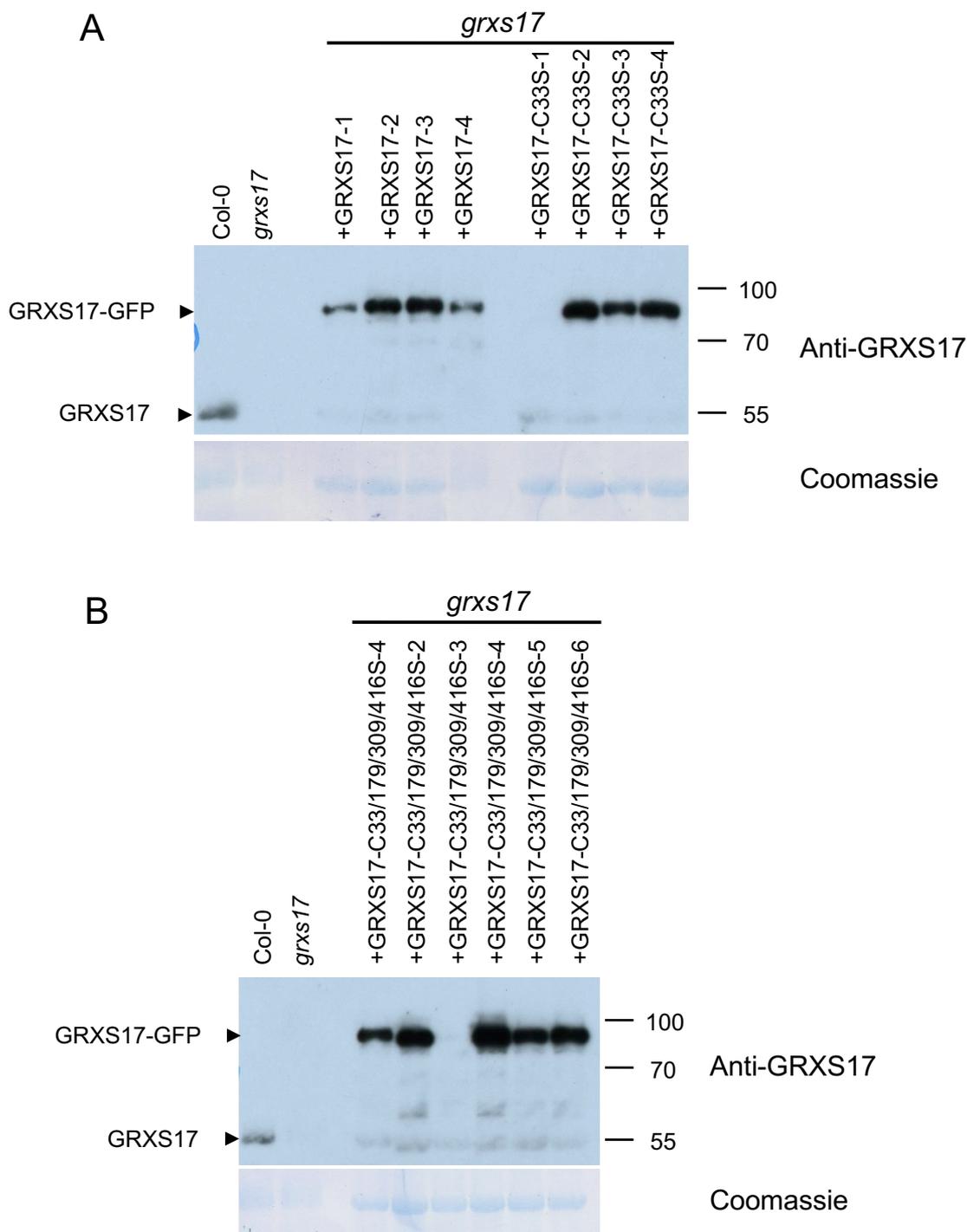


Figure EV11: GRXS17 protein accumulation in *grxs17* complemented lines. Total protein extracts were prepared from 2 weeks old plantlets. Samples were prepared from wild-type (Col-0), *grxs17* homozygote mutant, and *grxs17* complemented with a *Pr35S:GRXS17:GFP* construct. Protein extracts were separated by SDS-PAGE and probed with antibodies directed against GRXS17. In Col-0, the 50 kDa signal corresponds to the native GRXS17 protein. In the complemented lines, the 80 kDa signal corresponds to the GRXS17:GFP fusion protein.

(A) GRXS17-1 to 4, GRXS17-C33S-1 to 4 and (B) GRXS17-C33/179/309/416S-1 to 6 represent independent *grxs17* mutant lines which were complemented with GRXS17:GFP, GRXS17-C33S:GFP and GRXS17-C33/179/309/416S:GFP fusion proteins, respectively.

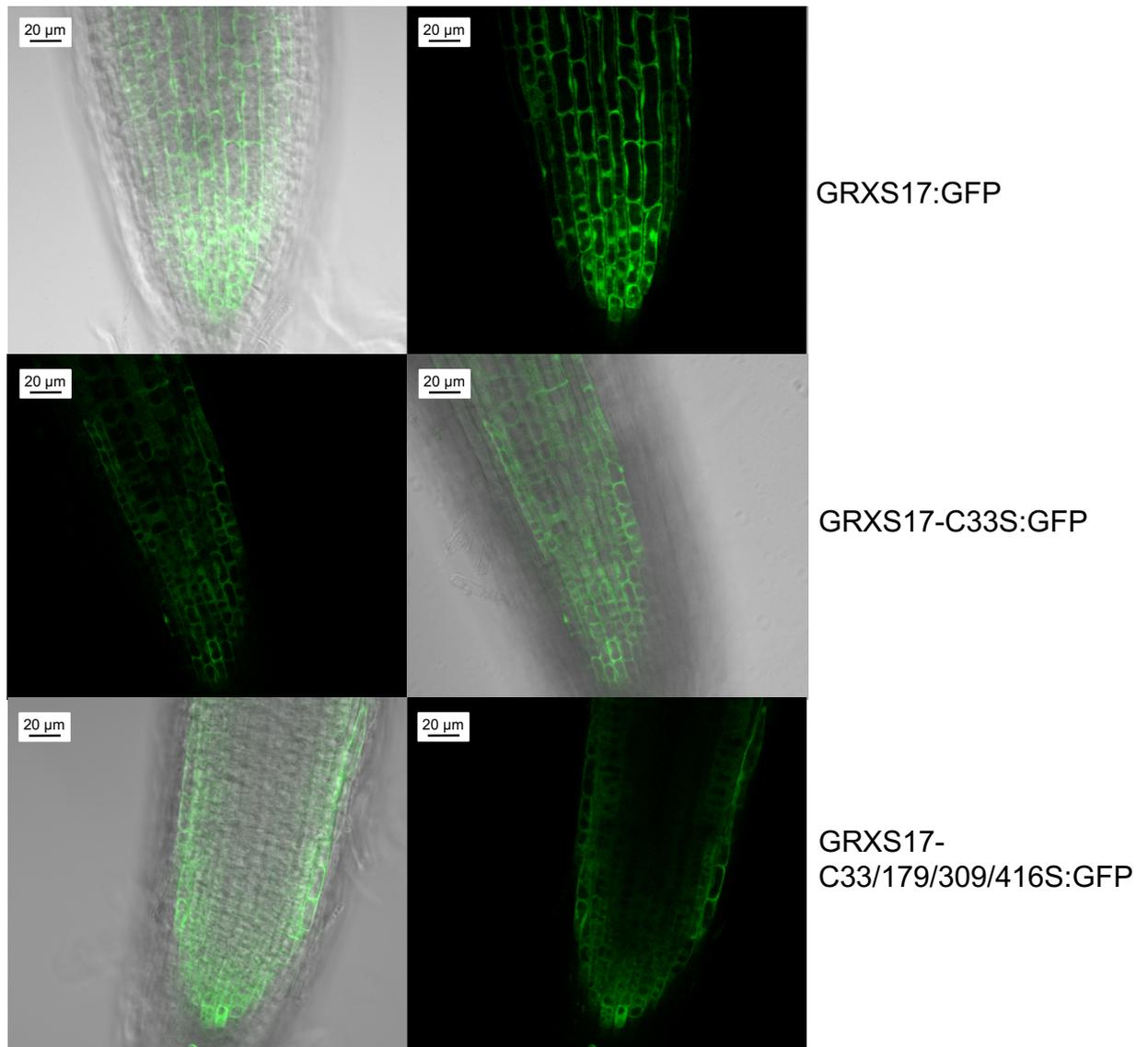


Figure EV12: GRXS17:GFP protein accumulation in *grxs17* complemented lines.

GRXS17:GFP fluorescence was monitored by confocal microscopy in root tips from 2 weeks old plantlets. GRXS17:GFP, GRXS17-C33S:GFP and GRXS17-C33/179/309/416S:GFP represent *grxs17* mutant lines which were complemented with GRXS17:GFP, GRXS17-C33S:GFP and GRXS17-C33S/C179S/C309S/C416S:GFP fusion proteins, respectively. Similar expression patterns were observed with other complemented lines.

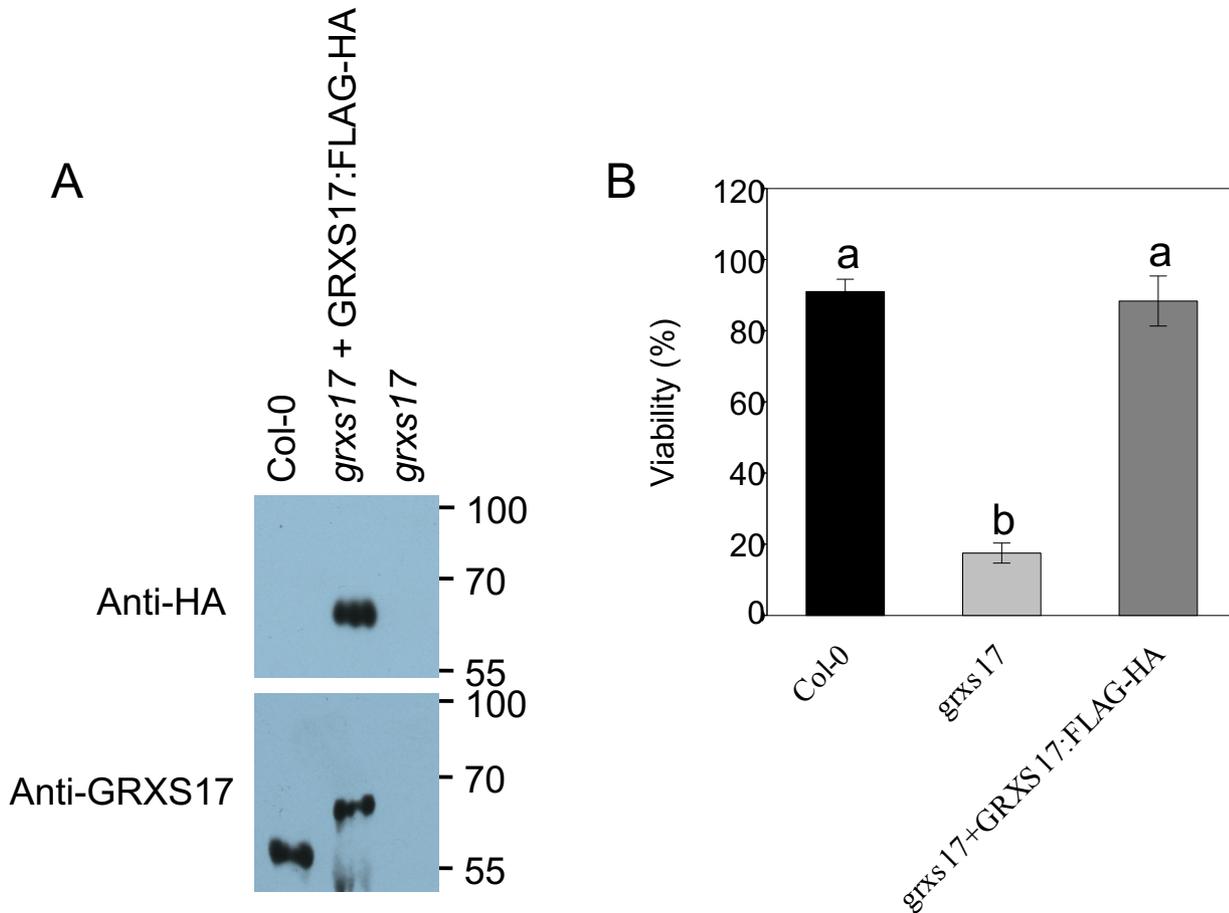


Figure EV13: GRXS17:FLAG-HA protein accumulation in *grxs17* complemented lines. (A) Total protein extracts were prepared from 2 weeks old plantlets. Samples were prepared from wild-type (Col-0), *grxs17* homozygous mutant, and *grxs17* complemented with a *Pr35S:GRXS17:FLAG-HA* construct. Protein extracts were separated by SDS-PAGE and probed with antibodies directed against HA or GRXS17 respectively. In Col-0, the ~55 kDa signal corresponds to the native GRXS17 protein. In the complemented lines, the ~60 kDa signal corresponds to the GRXS17:FLAG-HA fusion protein. (B) TMHT complementation of the *grxs17* mutant by the GRXS17:FLAG-HA protein. Data are means of 4-10 biological repetitions \pm SE, $n = 20-25$. The letters a and b indicate a significance of $p > 0.1$ and $p < 0.00001$ respectively by the Student's t-test.

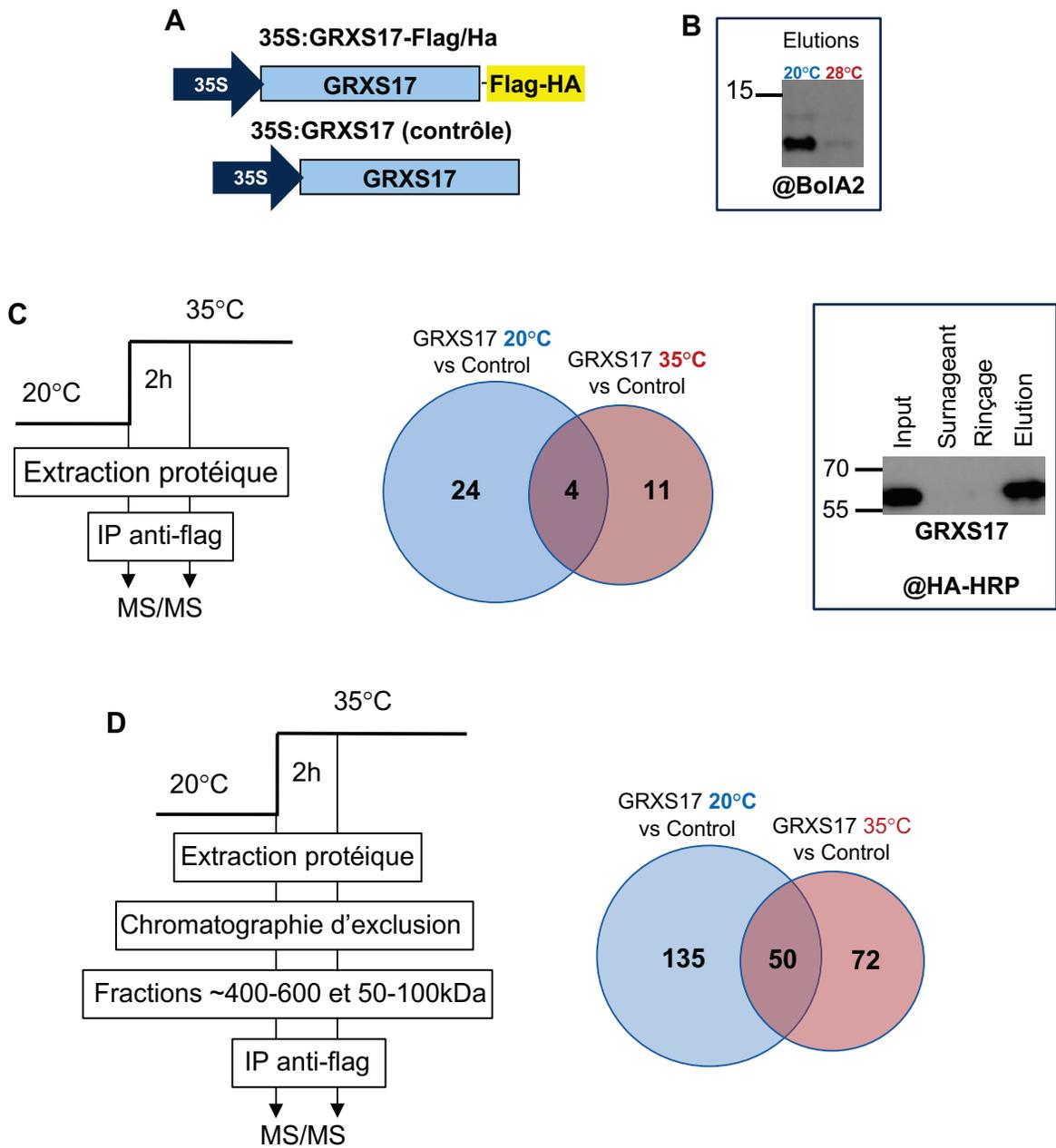


Figure 54 : Recherche de cibles et/ou de partenaires de GRXS17 à 20°C et 2h à 35°C par immunoprécipitation à partir de la lignée 35S:GRXS17-Flag/Ha.

Des plantes mutantes *grxs17* exprimant la protéine de fusion GRXS17:FLAG-HA ou GRXS17 sans tag (A) ont été récoltées après 14 jours de croissance à 20°C ou après un stress thermique de 24h à 28°C ou de 2 heures à 35°C. B. Western blot, révélant la présence de BoIA2, sur les éluions d'une IP préliminaire d'optimisation faite sur des extraits de protéines de plantules traitées 24h à 28°C. C. Des immunoprécipitations (5 répétitions par condition, 20 au total) avec des billes anti-Flag ont été réalisées. Plan expérimental à gauche et diagramme de Venn illustrant les protéines identifiées au centre. A droite, western blot des échantillons de la lignée étiquetée révélé avec l'anticorps monoclonal anti-HA-HRP de l'input, de deux étapes de l'IP (en contrôle négatif) et de l'éluion finale d'une des cinq répétitions (représentative des quatre autres). D. Les extraits protéiques de la lignée Flag-Ha ont été séparés par chromatographie d'exclusion conformément à la figure 2C de l'article du chapitre 2 (Martins et al). Des fractions HMW (400-600 kDa) et LMW (50-100kDa) ont été utilisées pour l'immunoprécipitation en utilisant des billes anti-Flag. Les peptides collectés ont été identifiés et quantifiés par spectrométrie de masse. Plan expérimental à gauche et diagramme de Venn illustrant les protéines identifiées à droite.

II. Description complémentaire de la recherche de cibles et/ou de partenaires :

Dans l'article, des cibles et/ou des partenaires de GRXS17 ont été recherchés afin de valider sa fonction de chaperonne et son rôle associé dans la thermotolérance. Dans ce paragraphe, une figure et deux tableaux complémentaires sont proposés afin d'illustrer les résultats présentés dans l'article (Figure 54, Tableaux 1 et 2). Pour rappel, deux stratégies différentes ont été employées. Premièrement, 5 immunoprécipitations indépendantes ont été réalisées à partir de protéines provenant de la lignée 35S:GRXS17-Flag/Ha et 5 autres à partir de la lignée contrôle 35S:GRXS17 sans tag (lignée donnée par Pascal Rey) (Figure 54C). Deux conditions ont été utilisées : des plantules ayant poussé 14 jours à 20°C et ayant subi un traitement thermique de 2h à 35°C. Deuxièmement, de manière préliminaire, une immunoprécipitation complémentaire à partir de certaines fractions de FPLC a été réalisée (Figure 2 de l'article). Les fractions 18-21 correspondant aux complexes de haut poids moléculaires (HMW) et 22-25 aux faibles poids moléculaires (LMW) pour les plantes cultivées à 20°C et les fractions 16-19 et 22-26 pour les plantes traitées pendant 2h à 35°C (voir le western de la figure 2C) ont été collectées et soumises à une immunoprécipitation (Figure 54D). Les différents échantillons ont été envoyés à notre collaborateur Christophe Marchand de l'IBPC à Paris pour effectuer la spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines. Les résultats de l'analyse de la première stratégie sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Pour cette première stratégie, une méthode d'analyse très stringente (c'est pourquoi le nombre de candidats est relativement faible) a été utilisée et au total 28 protéines (dont GRXS17) à 20°C et 15 protéines (dont GRXS17) après 2h à 35°C ont été identifiées de manière significative (Figure 54C, Tableaux 1 et 2). Ces protéines sont présentes dans au moins 3 réplicats sur 5 et ne se trouvent pas dans les 5 réplicats de la lignée contrôle (sans tag). Après 2h à 35°C, un ensemble différent de protéines a été identifié, puisque 4 protéines seulement sont communes aux deux températures. Parmi elles, nous avons systématiquement identifié la protéine nucléocytoplasmique BOLA2 (Tableaux 1 et 2). Nous avons validé la présence de BOLA2 lors des expériences préliminaires visant à optimiser nos conditions. Ces expériences ont été menées sur des plantules ayant poussé 14 jours à 20°C et traitées 24h à 28°C (Figure 54B). BOLA2 a aussi été retrouvée dans la liste d'interactants provenant d'une analyse MS/MS sur ces échantillons.

Tableau 1 : Liste des protéines issues des IPs à 20°C.

Accession	Nom du gène	Nom protéine	Localisation prédite	Score
F4III4	MGP1	Probable ATP synthase 24 kDa subunit	Chloroplaste, membrane, mitochondrie, nucléole	45,198
F4JX83	At5g53490	Thylakoid lumenal 17.4 kDa protein	Chloroplaste, région extracellulaire, membrane	21,842
F4III4	PDIL1-4	Protein disulfide isomerase-like 1-4;Protein disulfide-isomerase	Chloroplaste, membrane, mitochondrie, nucléole	28,274
O23299	ECI2	Enoyl-CoA delta isomerase 2	Cytoplasme, peroxysome	37,001
O80796	VIPP1	Membrane-associated protein VIPP1	Chloroplaste, membrane plasmique	40,06
O80837	DBP	Remorin	Membrane plasmique	66,268
O82326	At4g34290	SWIB/MDM2 domain superfamily protein	Chloroplaste	18,51
P23586	STP1	Sugar transport protein 1	Cytoplasme, membrane plasmique, noyau, plasmodesme, vacuole	15,273
P56804	RPS14	30S ribosomal protein S14	Chloroplaste	26,649
Q37165	ndhA	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 1	Chloroplaste, membrane plasmique	13,438
Q39024	MPK4	Mitogen-activated protein kinase 4	Cytoplasme, noyau	35,532
Q39129	STR16	Thiosulfate sulfurtransferase 16	Chloroplaste	22,615
Q68211	BOLA1	Protein BOLA1	Chloroplaste	74,822
Q8GW78		Clp protease-related protein At4g12060	Chloroplaste	43,333
Q8LBI1	ATL5	60S ribosomal protein L5-1	Chloroplaste, cytoplasme, nucléole, noyau, membrane plasmique, vacuole	119,2
Q8LE52	DHAR3	Glutathione S-transferase DHAR3	Chloroplaste	24,605
Q93WJ8	MDAR4	Probable monodehydroascorbate reductase	Chloroplaste, cytoplasme	29,3
Q93ZY3	STT3A	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	Chloroplaste, réticulum endoplasmique, membrane plasmique	33,554
Q94AI6	SEC6	Exocyst complex component SEC6	Cytoplasme, membrane plasmique, plasmodesme	11,926
Q96514	CYP71B7; CYP71B28	Cytochrome P450 71B7;Cytochrome P450 71B28	Chloroplaste, membrane plasmique	36,678
Q9FIC3	BOLA2	Protein BOLA2	Cytoplasme, noyau	48,317
Q9M885	RPS7B	40S ribosomal protein S7-2	Chloroplaste, cytoplasme	34,688
Q9S9M7	T24D18.18	Uncharacterized Nuclear protein	-	20,631
O23553	BAM3	Beta-amylase 3	Chloroplaste, région extracellulaire	194,07
O82533	FTSZ2-1	Cell division protein FtsZ homolog 2-1	Chloroplaste, cytoplasme	323,31
P17745	TUFA	Elongation factor Tu	Apoplaste, chloroplaste, membrane plasmique, mitochondrie, nucléole, noyau	323,31
Q9M7Z1	BCE2	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex	Chloroplaste, cytoplasme, mitochondrie	227,1
Q9ZPH2	GRXS17	Monothiol glutaredoxin-S17	cytoplasme, noyau	323,31

La présence de BOLA2 est cohérente avec les études antérieures qui ont décrit une interaction de GRXS17 avec BOLA2 (Couturier et al., 2014). Plusieurs protéines ayant une localisation chloroplastique prédite telles que la glutathion S-transférase DHAR3, BOLA1, la thiosulfate sulfurtransférase STR16 et la protéine 30S ribosomale S14 RPS14 ont été identifiées dans cette approche (Tableaux 1 et 2). Il semble donc peu probable que ces isoformes interagissent directement avec GRXS17. Des interactants se situant dans le même compartiment cellulaire, telles qu'une protéine disulfure isomérase (PDIL) et l'enzyme antioxydante monodéhydroascorbate réductase 4 (MDAR4) ont été identifiés à 20°C (Tableau 1). En effet, des PDI et des MDAR ont déjà été identifiées comme interactants de TRX ou de GRX (ROUHIER et al., 2005; Hägglund et al., 2008; Montrichard et al., 2009; Pérez-Pérez et al., 2017). D'autres protéines à 20°C paraissent intéressantes comme un transporteur de sucres STP1 puisque la croissance des plantes nécessite des sucres, ce qui pourrait être en lien avec les défauts de croissance du mutant (Cordoba et al., 2015). La protéine Map kinase MPK4 activée lors de signaux développementaux et lors de stress biotiques et abiotiques est un candidat intéressant également (Lin and Chen, 2018). Après le stress thermique de 2h à 35°C les protéines identifiées sont assez différentes de celles identifiées à 20°C. Des protéines comme les protéines kinases CCK2 et MKK2 (Tableau 2) pourraient être des partenaires potentiels de GRXS17 mais des investigations supplémentaires sont nécessaires pour valider leur interaction.

La seconde stratégie avait pour but d'identifier des cibles et/ou des partenaires qui étaient spécifiquement localisés dans les complexes de HMW mais aussi au LMW aux deux températures. Cet essai plus restrictif n'a pu être réalisé qu'une seule fois pour chaque condition (lignée étiquetée, lignée contrôle, à 20°C et à 2h à 35°C), l'analyse statistique qui en découle est donc limitée. Cette approche est différente de la première puisqu'au lieu de directement partir d'extraits totaux de plantes, une étape supplémentaire de séparation *via* une chromatographie d'exclusion par la taille a été réalisée et seules les fractions où GRXS17 a été détectée ont été utilisées (se référer à la Figure 2C). Cette stratégie a permis d'identifier 185 et 122 protéines (dont GRXS17) à 20°C et après un traitement thermique de 2h à 35°C (Figure 54D). Parmi ces protéines, 50 protéines sont communes aux deux conditions. Comme précédemment, BOLA2 a été identifiée dans les deux conditions. Cette information permet de valider cette expérience préliminaire. Néanmoins, elle devra être reproduite afin de consolider les résultats trouvés.

Tableau 2 : Liste des protéines issues des IPs à 2h à 35°C.

Accession	Nom du gène	Nom protéine	Localisation prédite	Score
B9DFC0	ARGAH2	Arginase 2, mitochondrial	Chloroplaste, mitochondrie	30,676
O23157	MEE59	MEE59 maternal effect embryo arrest 59	Noyau	48,806
O64816	CPCK2	Casein kinase II subunit alpha,	Chloroplaste, cytoplasme, noyau	59,927
P52032	GPX1	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 1	Chloroplaste	32,08
P56804	RPS14	30S ribosomal protein S14	Chloroplaste	26,649
Q39054	CNX1	Molybdopterin biosynthesis protein CNX1; Molybdopterin molybdenumtransferase; Molybdopterin adenyllyltransferase	Cytoplasme, noyau	50,718
Q5XF82-2	JAL11	Jacalin-related lectin 11		25,151
Q68211	BOLA1	Protein BOLA1	Chloroplaste	74,822
Q8L7W0	SH3P3	SH3 domain-containing protein 3		40,715
Q9FIC3	BOLA2	Protein BOLA2	Cytoplasme, noyau	48,317
Q9MBA1	CAO	Chlorophyllide a oxygenase	Chloroplaste	42,82
Q9SXE9	At1g62480	Vacuolar calcium-binding protein-related	Noyau	24,395
Q9M084	IBI1	Aspartate-tRNA ligase 2	Cytoplasme, réticulum endoplasmique	312,66
Q9S7U9	MKK2	Mitogen-activated protein kinase kinase 2	Cytoplasme	32,829
Q9ZPH2	GRXS17	Monothiol glutaredoxin-S17	Cytoplasme, noyau	323,31

DISCUSSION

Dans l'article, nous montrons qu'en plus de sa capacité à transférer des cœurs Fe-S à d'autres protéines, GRXS17 fonctionne comme une protéine chaperonne dépendante de l'oxydo-réduction. Elle possède une double activité foldase et holdase. Le stress oxydatif et le stress thermique induisent une perte du cœur Fe-S suivie d'une sulfénylation des cystéines puis de la formation de liaisons disulfure entre les monomères, processus qui entraîne l'activation de son activité holdase. Lors de ce processus, GRXS17 passe d'une forme à faible poids moléculaire environ 110 kDa (LMW) à un complexe à haut poids moléculaire >1500 kDa (HMW) (Figure 1 de l'article). Ce « switch » redox dépend de la présence de cystéines conservées impliquées dans la coordination des cœurs Fe-S et de la cystéine du domaine thiorédoxine en N-terminal. En relation avec cette fonction de chaperonne, nous montrons que GRXS17 confère une thermotolérance de manière dépendante de l'ensemble de ces quatre cystéines. En résumé, nous révélons le mécanisme d'un changement d'activité dépendant de la perte des cœurs Fe-S de GRXS17 pour fonctionner comme une holdase protégeant la plante des dommages causés par le stress thermique. Nous avons donc mis en évidence une nouvelle fonction moléculaire de GRXS17 chez la plante à des températures normales mais également lors de températures plus élevées.

Des analyses d'immunoprécipitation ont été réalisées afin de rechercher des cibles et/ou des partenaires de GRXS17 liés à sa fonction de chaperonne. Ces analyses suggèrent que l'identité des interactants de GRXS17 est différente après un stress thermique de 2h à 35°C. Par contre, la protéine BOLA2 est présente dans les analyses aux deux températures, ce qui valide notre expérience puisque cette protéine a déjà été identifiée comme interactant de GRXS17 (Couturier et al., 2014). Mais quel est le lien entre GRXS17 et BOLA2 notamment lors de l'augmentation de la température ? Pour l'interaction à 20°C, nous pourrions imaginer un rôle dans le transfert du cœur Fe-S à une apo-protéine comme cela a été montré chez l'humain. En effet, la protéine BOLA2 humaine a été identifiée comme interagissant avec l'orthologue de GRXS17, la GRX3 humaine (Li et al., 2012). Ces protéines forment un complexe, dans lequel deux BOLA2 interagissent avec GRXS3 *via* deux cœurs Fe-S et transmettent ces cœurs à l'apo-anamorsine, donnant l'holo-anamorsine mature (Banci et al., 2015). La BOLA2 humaine est un

orthologue de la Fra2 de levure (protéine agissant avec Grx3/4) aussi (Li and Outten, 2012). Il est donc possible d'imaginer un mécanisme conservé dans le transfert des cœurs Fe-S chez la Grx3 humaine, le couple Grx3/4 de levure et GRXS17. Bola2 a également été retrouvée après un traitement de 2h à 35°C dans les deux IPs. Nous pourrions donc nous demander si GRXS17 pourrait s'associer à Bola2 afin de la protéger *via* son activité chaperonne. Elle pourrait interagir avec GRXS17 à environ 110kDa (LMW) ou bien dans le complexe de HMW identifié à 520 kDa (Figure 2 de l'article). Pour répondre à cette hypothèse, l'anticorps anti-Bola2 pourrait être utilisé lors d'un western blot à partir de ces fractions.

Un autre interactant probable est l'enzyme antioxydante monodéhydroascorbate réductase 4 (MDAR4) qui se lie à la membrane du peroxyosome et élimine l'H₂O₂ toxique dans le cycle ascorbate-glutathion (Tableau 1) (Eastmond, 2007). Son mutant présente un phénotype létal conditionnel car ses graines sont incapables de décomposer les lipides de stockage pour fournir le carbone et l'énergie nécessaires au développement précoce des plantules (Eastmond, 2006). Dans un premier temps, pour mieux comprendre le lien entre MDAR4 et GRXS17, les activités MDAR pourraient être testées dans les mutants *grxs17*. En effet, GRXS17 pourrait interagir avec MDAR4 afin que cette dernière conserve son activité. MDAR4 n'est pas retrouvée dans la liste de protéines après 2h à 35°C. Plus globalement, les protéines oxydoréductrices n'ont été identifiées qu'à 20°C ce qui suggère un « switch » de fonction entre une éventuelle fonction redox de GRXS17 vers une activité chaperonne associée au stress. STP1, un transporteur de sucres, a aussi été identifié (Tableau 1) (Cordoba et al., 2015). Il est impliqué dans le transport transmembranaire des monosaccharides (Szenthe et al., 2007; Cordoba et al., 2015; Yamada et al., 2017). Un autre interactant potentiel de GRXS17, ASUS1, une sucrose synthase qui synthétise une molécule de saccharose à partir d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose a été également identifiée parmi les partenaires de GRXS17 (Knesting et al., 2015). Le mutant *grxs17* présente des défauts de croissance à 20°C (chapitre 1) (Cheng et al., 2011a). Le sucre est un élément important dans la croissance de la plante, nous pourrions donc imaginer un lien entre le métabolisme du sucre et GRXS17 (voir le chapitre 3).

D'autre part, plusieurs protéines kinases ont été révélées par cette analyse, il s'agit de MPK4 à 20°C et CPCK2 et MKK2 à 35°C (Tableaux 1 et 2). Les MAPK sont connues pour phosphoryler des protéines (activation/inactivation) mais également pour agir dans les voies de transduction

du signal comme lors de la perception d'un stress thermique (Mittler et al., 2012). La protéine MKK2 peut fortement activer la MPK4 par phosphorylation notamment lors de stress salin et froid (Teige et al., 2004). Il est également connu que la cascade de phosphorylation MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 est impliquée dans la signalisation ROS (Pitzschke et al., 2009). CPK2 (également appelée CKA4) semble, quant à elle, impliquée dans la réponse à l'augmentation de la température puisque son mutant est moins thermotolérant et l'activation des gènes de réponses au stress thermique est réduite (Wang et al., 2014). Le nombre de protéines kinases dans les listes d'interactants potentiels avec GRXS17 est assez conséquent. Il est alors possible d'imaginer que GRXS17 soit phosphorylée par une protéine kinase et/ou à l'inverse, GRXS17 pourrait réguler ces protéines. Ces régulations pourraient intervenir dans le rôle de GRXS17 dans la croissance de la plante et/ou celui dans la thermotolérance. Pour répondre à ces hypothèses, nous avons débuté une collaboration avec le groupe de Heribert Hirt. Dans un premier temps, ces collaborateurs vont rechercher une éventuelle phosphorylation de la protéine GRXS17. Dans un second temps, ils vont s'appuyer sur l'étude du mutant *grxs17* dans le but de détecter un éventuel impact de la mutation sur les activités des Map kinases.

Aucune protéine à cœur Fe-S du complexe CIA n'a été retrouvée dans les IPs comme cela a été précédemment montré (Iñigo et al., 2016). La technique qu'ils ont employée n'est pas la même que la nôtre puisqu'à la place d'une immunoprécipitation avec des billes anti-flag, c'est une purification sur colonne par affinité en tandem avec deux tag TAP (en N- et en C-terminal) à partir d'extraits cellulaires provenant d'une suspension cellulaire d'*Arabidopsis thaliana* transformée avec les deux constructions. Il se peut qu'avec la méthode d'extraction en aérobie employée et les tissus utilisés, nous n'ayons pas pu recueillir des protéines à cœur Fe-S à cause de leur instabilité.

La seconde stratégie employée est une méthode originale qui a permis d'isoler des interactants à partir de fractions contenant GRXS17. Elle n'a pu être réalisée qu'une seule fois mais des essais complémentaires sont envisagés. Cette fois-ci, les fractions de HMW vont être séparées des LMW et des répétitions techniques seront ajoutées afin d'obtenir une analyse statistique solide. Les essais sur les complexes de HMW seront très intéressants puisqu'ils pourraient permettre de mettre en évidence des interactants de GRXS17 probablement en lien avec sa fonction de chaperonne. Les listes HMW et LMW pourront également être comparées en plus

de la comparaison des deux températures. D'autres essais toujours liés à la recherche d'interactants peuvent être entrepris sur les fractions de FPLC récupérées. Des western blot pourront être réalisés à partir de ces fractions dans les mêmes conditions que la Figure 2C mais avec cette fois-ci les anticorps d'interactants potentiels comme par exemple BolA2 et HSP70. Ceci permettra de voir si ces protéines candidates co-localisent avec les complexes de HMW identifiés, ce qui suggèrera que ces protéines sont liées à ces complexes. GRXS17 étant une protéine chaperonne, nous pouvons même supposer que ces protéines seraient protégées par sa fonction holdase. Pour finir, le type de liaison dans les fractions HMW et LMW notamment des liaisons par des ponts disulfures entre le GRXS17 et ses interactants pourra être défini. Pour cela, des westerns avec deux types de gels peuvent être faits : un gel SDS-page avec des protéines traitées avec un réducteur et un autre identique mais sans réducteur pour visualiser les éventuels ponts disulfures. Afin de visualiser les liaisons faibles, des gels natifs sans SDS pourront être utilisés. Cette expérience est encore en phase d'optimisation puisque la concentration en protéine des fractions utilisées est trop faible pour détecter les liaisons. En effet, dans la condition sans réducteur, le signal est très peu détecté. De nouveaux essais avec des fractions plus concentrées seront réalisés.

Enfin, les deux stratégies ne mettent pas en évidence les mêmes interactants. Les conditions d'analyse des listes de la première stratégie sont peut-être un peu trop stringentes puisque peu de protéines sont retenues par rapport au nombre total de protéines identifiées par l'analyse MS/MS (28 vs 1681 à 20°C et 15 vs 1670 protéines à 35°C). Un second type d'analyse plus permissif pourrait être envisagé. Par la suite, des investigations supplémentaires vont être nécessaires pour la validation de ces cibles comme des essais en double hybride en levure ou de BiFC *in planta*. En complément, des mutants de ces protéines et des doubles mutants avec *grxs17* pourraient être caractérisés. BolA2 a pu être validée sur les éluions d'IPs réalisées sur des traitements thermiques à 28°C. De manière très préliminaire, HSP70 a été également validée pour la première stratégie en western blot sur un mélange des 5 éluions de la lignée étiquetée (absence d'HSP70 dans le contrôle). L'anticorps utilisé reconnaît les HSP70 cytosoliques ce qui ne permet pas de discriminer l'isoforme détectée dans les éluions de 20°C et de 35°C (signal moins fort). Nous pourrions imaginer qu'HSP70 interagirait avec GRXS17 dans des conditions non stressantes dans le transfert de cœurs Fe-S comme cela a été montré pour l'HSP70 mitochondriale de levure (Dutkiewicz and Nowak, 2018).

Parmi l'ensemble des protéines identifiées, certaines d'entre elles pourraient interagir avec GRXS17 *via* ses activités chaperonnes notamment après un stress thermique/oxydatif pour les protéger de l'agrégation. Nous pouvons donc supposer qu'en absence de GRXS17, un plus grand nombre de ces protéines pourraient être agrégées lors d'un stress thermique/oxydatif. Pour vérifier cela, le niveau d'agrégation des protéines entre des extraits protéiques provenant de Col-0 et de *grxs17* à 20°C mais aussi à partir de plantes traitées 2h à 35°C ont été comparés. Il semblerait y avoir plus d'agrégats dans *grxs17* par rapport à Col-0 notamment à 35°C (données préliminaires non montrées). Par la suite, la présence des protéines candidates dans les agrégats de protéines provenant de *grxs17* pourrait être vérifiée.

CHAPITRE 3

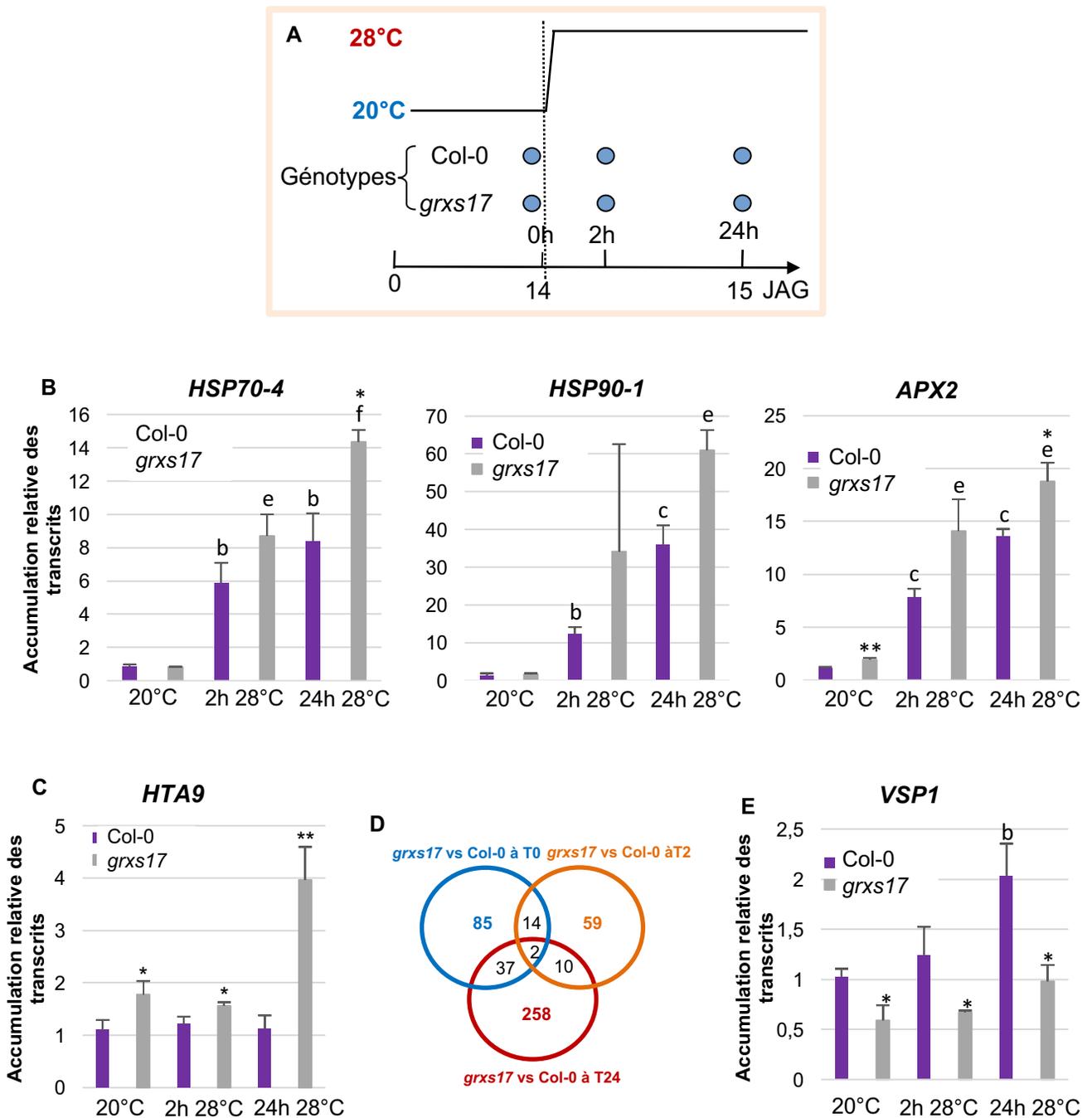


Figure 55 : Analyse transcriptomique de Col-0 et *grxs17* à 20°C et à 28°C par séquençage de l'ARN.
A. Plan de l'expérience. **B.** Accumulations relatives des transcrits de 3 gènes induits en réponse à la température : *HSP70-4*, *HSP90-1* et *APX2*. Elles ont été obtenues par RT-PCR quantitative à partir des mêmes échantillons utilisés pour le séquençage de l'ARN (moyenne des 3 réplicats). **C.** Accumulation relative des transcrits d'*HTA9*. **D.** Diagramme de Venn représentant les gènes différentiellement exprimés dans *grxs17* par rapport à Col-0, avec un seuil de significativité de 5%. Les deux gènes centraux sont *GRXS17* et *VSP1*. **E.** Accumulations relatives des transcrits de *VSP1* dans les mêmes conditions que précédemment. Des t-test de Student ont été réalisés sur les données et des p-value inférieures à 0,05, 0,01 et 0,001 sont représentées par *, ** ou *** pour la comparaison *grxs17* vs Col-0. Ces mêmes p-value sont également représentées par a, b ou c pour les comparaisons T2 et T24 vs T0 chez Col-0 et d, e et f chez *grxs17*.

CHAPITRE 3 :

Recherche de(s) fonction(s) par des analyses globales : étude du transcriptome et du métabolome de *grxs17*

Les plantes, comme les autres organismes vivants répondent aux changements de température en mettant en place de nombreux mécanismes d'adaptation. Ces changements majeurs impliquent la reprogrammation de l'expression génique, la modification du protéome et du métabolome (se référer à la Figure 7 de l'introduction) (Mittler et al., 2012). Nous avons étudié ces modifications dans des plantes sauvages et dans des plantes mutantes *grxs17*. Ce chapitre 3 regroupe une analyse transcriptomique par séquençage de l'ARN et une analyse métabolomique réalisées sur *grxs17* et Col-0 (contrôle) en conditions normales (20°C) et lors de l'augmentation de la température (28°C).

I. Analyse transcriptomique du mutant *grxs17* soumis à des températures élevées :

I.1 Présentation de la stratégie et validation de l'expérience :

Pour essayer de préciser le rôle de GRXS17 dans la réponse à des températures modérément élevées, nous avons effectué une analyse de séquençage d'ARN (RNAseq). Nous avons décidé d'étudier la réponse transcriptionnelle à une augmentation de température de 28°C. *grxs17* est hypersensible à cette température contrairement à Col-0 dont la croissance, notamment sa croissance racinaire, n'est pas affectée (Figure 31 du chapitre 1). Le but était donc à la fois d'essayer de comprendre les défauts de croissance de *grxs17* par des comparaisons avec Col-0 mais également d'ouvrir de nouvelles pistes au travers de cette analyse globale. Pour cela, six conditions ont été choisies et sont présentées dans la figure 55A. Les plantules de Col-0 et de *grxs17* ont poussé 14 jours à 20°C dans des conditions classiques de culture (jours longs et 120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Elles ont ensuite été soumises à un stress thermique de 2h à 28°C et de 24h à

28°C. Pour chaque condition, les plantules entières provenant de trois réplicats techniques ont été analysées. Afin de vérifier que le stress thermique a bien été perçu par les plantes, trois gènes ont été testés au préalable par RT-PCR quantitative sur les échantillons d'ARN dans les six conditions. Il s'agit d'*HSP70-4*, d'*HSP90-1* et d'*APX2*, gènes de la HSR induits en réponse à un stress thermique (Jacob et al., 2017) (se référer au **III.** de l'introduction). Nos données montrent que les transcrits de ces gènes augmentent après le stress de 2h et 24h à 28°C ce qui permet de valider le traitement thermique de l'expérience (Figure 55B). On remarque qu'après 24h à 28°C, les niveaux de transcrits d'*HSP70* et d'*APX2* sont significativement plus élevés chez *grxs17* que chez Col-0. Par la suite, l'ensemble des ARN ont été séquencés par RNAseq et les données ont été analysées en collaboration avec l'ingénieure bioinformaticienne de notre plateforme, Marie-Christine Carpentier (se référer à la partie **II.7.1.4** du matériel et méthodes).

I.2 Analyse des données d'expression des transcrits de *grxs17* vs Col-0 à 20°C, 2h et 24h à 28°C :

La première question que nous nous sommes posés avant toute chose c'est de savoir comment la plante réagissait face une augmentation de la température à 28°C. Les qPCR précédentes montrent que trois gènes de la HSR sont surexprimés dans ces conditions notamment l'*HSP70-4* qui est connu pour être induit lors d'un passage de 12°C à 27°C pendant 2h (Kumar and Wigge, 2010). A cette température, les plantes Col-0 adaptent leur croissance pour survivre comme nous l'avons vu dans le chapitre 1. Pour cela, elles sont capables de reprogrammer leur transcriptome. Le transcriptome est notamment régulé face à une augmentation de la température à 27°C par les nucléosomes qui contiennent un variant d'histone H2A.Z (Kumar and Wigge, 2010). Ces nucléosomes enveloppent plus étroitement l'ADN ce qui influence la capacité de l'ARN polymérase II (Pol II) à transcrire des gènes de réponse à la température suggérant un mécanisme par lequel le transcriptome peut être régulé thermiquement. Le gène codant pour un variant d'histone H2A.Z a été testé en RT-qPCR sur les mêmes échantillons que le RNAseq (Figure 55C). Ses transcrits sont significativement plus accumulés à T0, T2 et notamment à T24, il pourrait donc y avoir plus d'H2AZ dans *grxs17*. Ces auteurs montrent également que 2454 gènes sont surexprimés et 2880 gènes sont sous-exprimés dans des plantes de 12 jours où la température de culture est passée de 12°C à 27°C (Kumar and Wigge, 2010).

Dans la stratégie que nous avons employée, les plantes ont poussé à 20°C et ont subi un traitement thermique de 28°C, l'écart de température est donc moins grand. Après séquençage, nos données d'expression brutes ont été analysées selon le pipeline d'analyse présenté dans la figure 66 de la partie « matériels et méthodes ». Au total, 14381 gènes sont pris en compte dans cette analyse et cette liste de gènes est appelée liste générale. Nous avons d'abord voulu savoir combien de gènes étaient dérégulés (surexprimés et sous-exprimés) en réponse à l'augmentation de la température. Il y a respectivement 931 et 490 gènes surexprimés chez Col-0 à T2 et T24 et 623 et 366 gènes qui sont sous-exprimés en réponse à l'augmentation de la température chez Col-0. Le nombre de gènes surexprimés et sous-exprimés est moins élevé que dans l'étude précédente. Cela peut être dû à un écart de température moins grand (12-27°C vs 20-28°C).

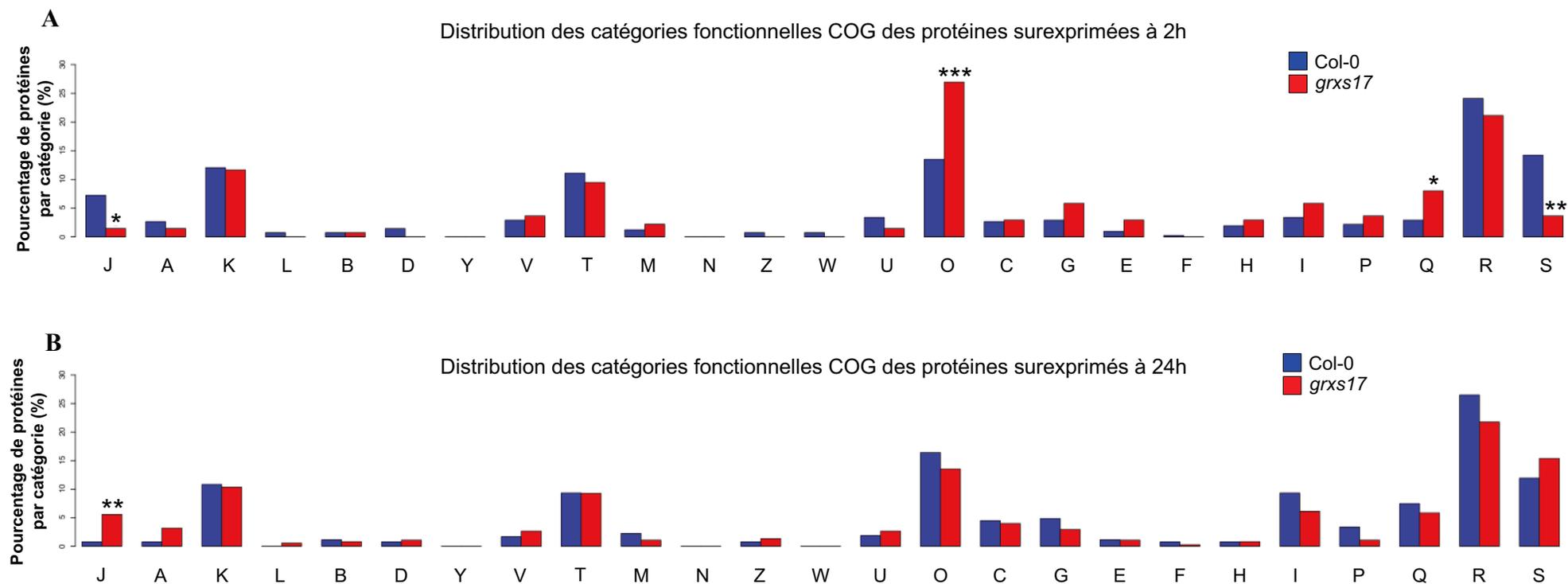
Les expressions de l'ensemble des gènes de Col-0 ont été comparées à celles du mutant *grxs17* dans les trois conditions (comparaison deux à deux, *grxs17* vs Col-0). A 20°C (appelé T0), 138 gènes sont différentiellement exprimés entre *grxs17* et Col-0, dont 85 gènes spécifiquement présents dans la condition T0 (Figure 55D). A 2h à 28°C (appelé T2), 85 sont différentiellement exprimés dont 59 spécifiques à T2. Enfin, à 24h à 28°C (appelé T24), il y a 307 gènes différentiellement exprimés dont 258 uniquement à T24. 14 gènes sont communs à T0 et T2, 10 gènes à T2 et T24 et 37 gènes à T0 et T24. Enfin, seuls deux gènes sont communs aux 3 conditions : *GRXS17* et *VSP1* (Vegetative Storage Protein 1). *VSP1* est un gène codant pour une phosphatase homologue à une protéine de stockage végétatif chez le soja (Shi et al., 2010). Nous avons confirmé l'accumulation différentielle de *VSP1* dans *grxs17* par RT-PCR quantitative sur les mêmes échantillons (Figure 55E). Chez Col-0, *VSP1* est induit après 2h ou 24h à 28°C ce qui n'est significativement pas le cas chez *grxs17*. Les expressions des HSF de classe A, B et C, protéines impliquées dans l'induction de la réponse au stress thermique, n'apparaissent pas parmi les gènes réunis dans le diagramme de Venn à l'exception d'HSFA8. A T24, son expression dans *grxs17* est significativement 3 fois supérieure à Col-0. De manière étonnante, les gènes connus pour répondre au stress thermique ne sont pas identifiés dans l'analyse différentielle.

Tableau 3 : Catégories fonctionnelles COG des protéines.

STOCKAGE ET TRAITEMENT DE L'INFORMATION	
J	Traduction, structure ribosomique et biogenèse
A	Traitement et modification de l'ARN
K	Transcription
L	Réplication, recombinaison et réparation
B	Structure et dynamique de la chromatine
PROCESSUS CELLULAIRES ET SIGNALISATION	
D	Contrôle du cycle cellulaire, division cellulaire, partition chromosomique
Y	Structure nucléaire
V	Mécanismes de défense
T	Mécanismes de transduction du signal
M	Biogenèse de paroi cellulaire / membrane / enveloppe
N	Motilité cellulaire
Z	Cytosquelette
W	Structures extracellulaires
U	Trafic intracellulaire, sécrétion et transport vésiculaire
O	Modification post-traductionnelle, renouvellement des protéines, chaperonnes
METABOLISME	
C	Production et conversion d'énergie
G	Transport et métabolisme des glucides
E	Transport et métabolisme des acides aminés
F	Transport et métabolisme nucléotidique
H	Transport et métabolisme des coenzymes
I	Transport et métabolisme lipidique
P	Transport et métabolisme des ions inorganiques
Q	Biosynthèse, transport et catabolisme des métabolites secondaires
PEU CARACTERISEE	
R	Prédiction de la fonction générale uniquement
S	Fonction inconnue

I.3 Classification des listes de gènes en groupe de protéines orthologues (COG) :

L'étude des gènes différentiellement exprimés de manière significative entre *grxs17* et Col-0 n'a pas permis de faire émerger des gènes candidats clairs (hormis *VSP1*). Une analyse plus globale de la liste générale a donc été entreprise. Pour cela, l'outil COG, qui permet de classer les protéines (issues des gènes du transcriptome) en fonction de leur catégorie fonctionnelle, a été utilisé (Tableau 3). Nous nous sommes focalisés sur les groupes de protéines des gènes induits ou réprimés à T2 et T24 chez *grxs17* vs Col-0.



C

	Nombre total	Annotées dans COG
T2	Surexprimés dans Col-0	414
	Surexprimés dans <i>grxs17</i>	137
T24	Surexprimés dans Col-0	268
	Surexprimés dans <i>grxs17</i>	377

Figure 56 : Classification en groupe de protéines orthologues (COG) des protéines produites à partir des transcrits d'intérêt surexprimés à 2h et 24h à 28°C.

Les protéines produites par les transcrits d'intérêts surexprimés 2h (A) et 24h à 28°C (B) chez Col-0 et *grxs17* ont été classées par groupe de protéines orthologues (COG). Seules les protéines caractérisées et disponibles dans la base de donnée COG ont pu être classées (C) : 414 gènes pour Col-0 et 137 gènes pour *grxs17* (A) et 268 gènes pour Col-0 et 377 gènes pour *grxs17* (B). Un test de chi-deux a été effectué et des p-value inférieures à 0,05, 0,01 et 0,001 sont représentées par *, ** et ***.

I.3.1 Etude des listes de gènes induits chez Col-0 et *grxs17* par l'augmentation de la température :

Dans un premier temps, nous avons repris la totalité des gènes induits à T2 et T24 et nous les avons comparés à T0. Comme indiqué ci-dessus, 931 et 490 gènes sont respectivement surexprimés chez Col-0 à T2 et T24 et 220 et 857 gènes chez *grxs17* (Figure 56C). Nous pouvons constater qu'il y a une grande différence du nombre de gènes surexprimés entre Col-0 et *grxs17* c'est-à-dire 931 gènes vs 220 à T2 et 490 vs 857 à T24. Les protéines codées par l'ensemble de ces gènes ont donc été comparées à la base de données COG. Elles ont été classées en fonction de leur catégorie fonctionnelle sous forme de pourcentage, le total faisant 100% (Figure 56A et B).

Pour les protéines des gènes surexprimées à T2, 4 catégories présentent des pourcentages de protéines significativement différents chez *grxs17* par rapport à Col-0 (Figure 56A). Il s'agit des catégories J, O, Q et S. Pour J et S, qui sont les catégories traduction//structure ribosomique//biogénèse et fonction inconnue, il y a un pourcentage de protéines inférieur chez le mutant par rapport à Col-0. La traduction, la structure ribosomique et la biogénèse sont significativement en pourcentage inférieur chez *grxs17* en comparaison à Col-0. Les catégories modification post-traductionnelle//renouvellement des protéines//chaperonnes (O) et biosynthèse/transport et catabolisme des métabolites secondaires (Q) ont un pourcentage de protéines dans *grxs17* plus grand par rapport à Col-0. Les gènes codant pour des protéines impliquées dans la biogénèse de protéines sont moins représentés en termes de pourcentage chez le mutant, contrairement à ceux codant pour des protéines du métabolisme secondaire et des modifications post-traductionnelles dont les chaperonnes. Sachant que GRXS17 est une protéine chaperonne de type foldase et holdase, cette information suggère qu'en absence de GRXS17 après 2h à 28°C, un plus grand nombre de gènes codant des protéines impliquées dans la modification post-traductionnelle, le renouvellement des protéines et avec une activité chaperonne sont induits. Il pourrait y avoir une compensation de l'absence de GRXS17 par l'induction d'autres chaperonnes. Nous avons donc voulu connaître quelles étaient les protéines classées dans cette catégorie. Les protéines de la catégorie O de *grxs17* ont été représentées dans le tableau A de la figure 57. Ces protéines ont également été classées par le système de classification PANTHER (<http://pantherdb.org/webservices/go/overrep.jsp>) (Figure 57B). Les

A

Numéro d'accension	Nom	Localisation prédite	Fonction moléculaire
AT1G02300	CATHB1	Rex, LY	Activité endopeptidase (Cys-T)
AT1G04980	PDI10	CH, RE, PC	Activité disulfide isomérase
AT1G06460	ACD32.1	PE	
AT1G07400	HSP20-like	CY	Chaperonne
AT1G18330	RVE7	NO	Liaison à l'ADN (FT)
AT1G28210	DJB1, ATJ1	MI	Chaperonne
AT1G48700	CP5, CUPULIFORMIS5		
AT1G49230	ATL78	ME	Activité transférase aux ions métalliques
AT1G53950	ubiquitin-40S ribosomal S27a-like protein	CY, MI, NO	Ubiquitine ligase
AT1G56300	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	CY	Chaperonne
AT1G59860	HSP20-like	CY	Chaperonne
AT1G74310	HSP101	CH, CY, NO	Chaperonne
AT2G18650	MEE16	ME, NO	Activité transférase aux ions métalliques/ ubiquitine ligase
AT2G20560	DNAJ heat shock family protein	CY	Chaperonne
AT2G21130	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	G, AP, CH, CY, ME, PL, VA	Isomérase, chaperonne
AT2G22980	SCPL13	Rex	Activité carboxypeptidase (de type Serine)
AT2G29500	HSP20-like	CY	Chaperonne
AT2G32120	HSP70T-2	CY	Chaperonne
AT3G04960	trichohyalin, putative (DUF3444)	G, CY, NO	
AT3G08970	ERDJ3A	CH, RE, PL	Activité oxydo-réductase
AT3G12580	HSP70	G, AP, PC, CH, CY, MI, NO, ME, VA	Chaperonne
AT3G46230	HSP17.4	CY	Chaperonne
AT3G53800	FES1B	CY, NO	Hydrolyse et échange des nucléotides adényliques
AT3G62600	ERDJ3B	CY, RE, ME	Chaperonne
AT4G10550	Subtilase family protein	Rex	Activité endopeptidase (Ser-T)
AT4G12400	HOP3	CY, NO	Interactant d'HSP70 et 90
AT4G21320	HSA32	NO	Activité catalytique
AT4G24190	HSP90.7	AP, CH, RE, ME, MI, NO, VA	Chaperonne
AT4G25200	HSP23.6-MITO	CH, MI	Chaperonne
AT4G39090	RD19	Rex, LY, VA, NO	Activité endopeptidase (Cys-T)
AT4G39250	ATRL1 / RAD-like 1	NO	Liaison à l'ADN
AT5G06690	TRXL2.1	CH	Activité oxydo-réductase
AT5G28540	BIP1	G, PC, CH, CY, RE, ME, NO, VA, PL	Chaperonne
AT5G37670	HSP20-like	CY, PE	Chaperonne
AT5G48570	FKBP65	CY, NO, VA	Isomérase, co-chaperonne , liaison calmoduline
AT5G51440	HSP20-like	CH, MI	Chaperonne
AT5G52640	HSP90.1	PC, CY, ME	Chaperonne

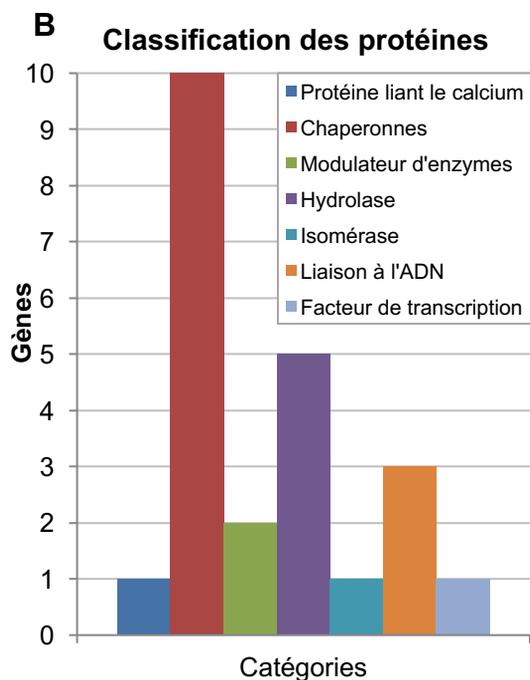


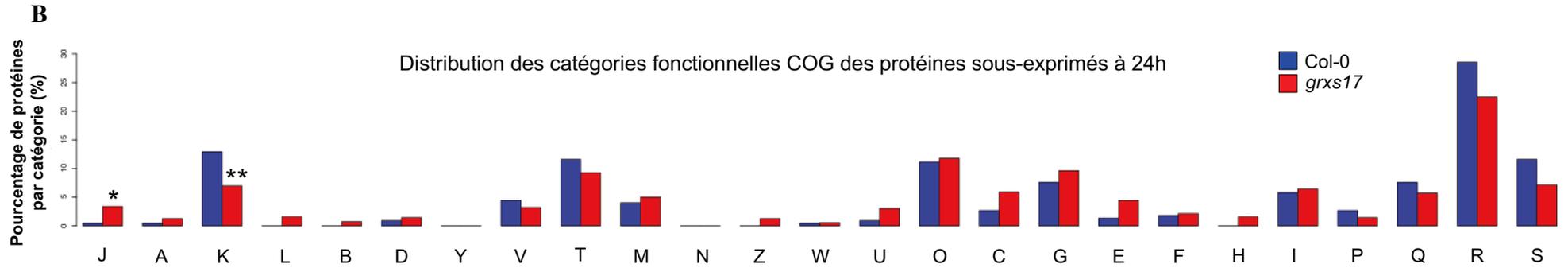
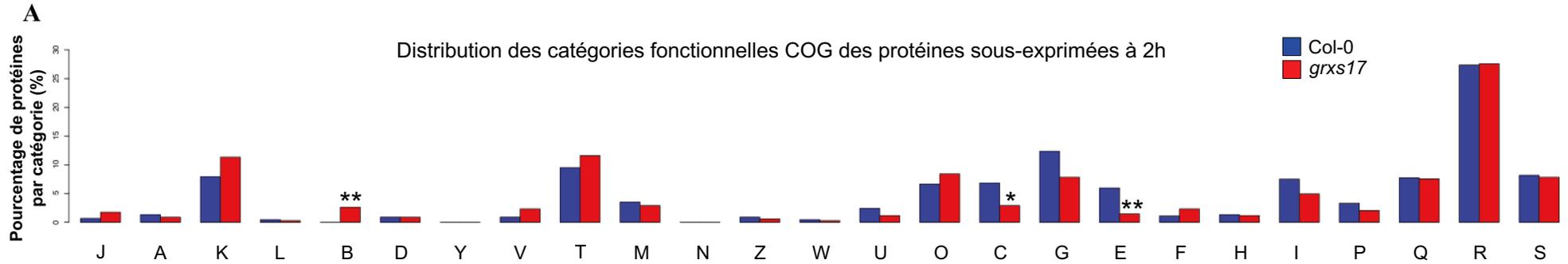
Figure 57 : Etude des protéines de la catégorie O chez *grxs17* à 2h à 28°C.

(A) Tableau des protéines de la catégories O contenant le numéro d'accension, le nom de la protéine, sa localisation et sa fonction moléculaire. Au total, 38 protéines ont été classées dans cette catégories. Les renseignements sur chaque gène proviennent de la base de données TAIR (B) Classification plus détaillée des protéines à l'aide du système de classification PANTHER. A partir de leur base de données, 23 des 38 protéines ont été classées par leur fonction.

Rex : région extracellulaire; **LY** : lysosome; **CH** : chloroplaste; **RE** : réticulum endoplasmique; **PC** : paroi cellulaire; **PE** : peroxyosome; **CY** : cytoplasme; **MI** : mitochondrie; **ME** : membrane; **G** : appareil de Golgi; **AP** : apoplaste; **PL** : plasmodesme; **VA** : vacuole; **NO** : noyau. **FT** : Facteur de transcription

protéines chaperonnes sont très présentes comme le montrent le tableau et le graphique et parmi elles, des protéines disulfures isomérases (PDI). Ces protéines ont une structure proche des TRX et sont présentes chez la plupart des eucaryotes (Edman et al., 1985; Houston et al., 2005). Ce sont des chaperonnes moléculaires importantes dans de nombreuses fonctions telles que le repliement des protéines ou l'isomérisation des ponts disulfures (Freedman et al., 1994; Wilkinson and Gilbert, 2004). On remarque aussi la présence des HSP20, 70, 90, 101 et DNAJ (Figure 57A). Elles sont, pour la majorité d'entre elles, localisées dans le cytoplasme et/ou le noyau mais parfois dans d'autres compartiments. Les gènes d'un certain nombre de protéines chaperonnes sont donc induits en proportion plus grande chez *grxs17* à 2h à 28°C. Des protéines aux fonctions de modification post-traductionnelle et de renouvellement de protéines comme des peptidases, des isomérases, des transférases, des oxydoréductases ainsi que des protéines se liant à l'ADN ont été identifiées (Figure 57). Ces différents facteurs sont induits en proportion plus grande chez *grxs17* que chez Col-0 à T2.

A T24, les pourcentages de protéines sont inversés chez *grxs17*, ils augmentent dans les catégories J et S et diminuent dans les catégories O et Q, à l'exception de la catégorie J de *grxs17* qui est significativement différente de Col-0 (Figure 56B). Cette catégorie traduction//structure ribosomique//biogénèse qui est plus faible à T2 chez *grxs17* est significativement plus riche en pourcentage de protéines à T24 suggérant un délai dans l'induction de cette voie.



C

		Nombre total	Annotées dans COG
T2	Sous-exprimés dans Col-0	623	451
	Sous-exprimés dans <i>grxs17</i>	626	343
T24	Sous-exprimés dans Col-0	366	224
	Sous-exprimés dans <i>grxs17</i>	813	560

Figure 58 : Classification en groupe de protéines orthologues (COG) des protéines produites à partir des transcrits d'intérêt sous-exprimés 2h et 24h à 28°C.

Les protéines produites par les transcrits d'intérêts sous-exprimés 2h (A) et 24h à 28°C (B) chez Col-0 et *grxs17* ont été classées par groupe de protéines orthologues (COG). Seules les protéines caractérisées et disponibles dans la base de donnée COG ont pu être classées (C) : 451 gènes pour Col-0 et 343 gènes pour *grxs17* (A) et 224 gènes pour Col-0 et 560 gènes pour *grxs17* (B). Un test de chi-deux a été effectué et des p-value inférieures à 0,05 et 0,01 sont représentées par * et **.

I.3.2 Etude des listes de gènes réprimés chez Col-0 et *grxs17* par l'augmentation de la température :

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux gènes sous-exprimés à T2 et T24. Je rappellerai qu'il y a 623 et 366 gènes respectivement à T2 et T24 chez Col-0 et 626 et 813 gènes chez *grxs17* (Figure 58C). Le nombre de gènes chez *grxs17* et Col-0 est également différent pour les gènes sous-exprimés à T24 avec près de 3 fois plus de gènes chez *grxs17* que chez Col-0.

A T2, le nombre de gènes est équivalent. Pour les protéines des gènes sous-exprimés à T2, les catégories B, C et E contiennent des pourcentages de protéines significativement différents chez *grxs17* par rapport à Col-0 (Figure 58A). Il y a significativement un pourcentage plus grand de protéines dans la catégorie structure et dynamique de la chromatine (B) et plus faible de protéines dans les catégories production et conversion d'énergie (C) et transport et métabolisme des acides aminés (E). L'accès aux gènes pour leur induction ou leur répression dépend de la condensation de la chromatine. Lors de l'augmentation de la température, il y a une reprogrammation génétique et métabolomique mise en place afin de répondre au stress (Mittler et al., 2012). Il pourrait donc y avoir une dérégulation dans cette voie qui pourrait expliquer, du moins en partie, les différences transcriptionnelles entre *grxs17* et Col-0 dans la réponse à une augmentation de température à 28°C.

A T24, deux catégories se distinguent en présentant des pourcentages significativement différents chez *grxs17*, il s'agit de la J et de la K (Figure 58B). Elles appartiennent à la grande catégorie fonctionnelle du stockage et du traitement de l'information. La catégorie J qui regroupe la traduction, la structure ribosomique et la biogénèse possède une proportion de protéines significativement plus grande que celle de Col-0. Pour la K qui regroupe les protéines impliquées dans la transcription, la proportion de protéines est significativement plus faible chez *grxs17* que chez Col-0.

Pour conclure, ces analyses permettent de mettre en évidence que les gènes des catégories du stockage et traitement de l'information et du métabolisme ont une expression dérégulée chez *grxs17* à T2 et T24 par rapport à Col-0.

I.4 Représentation des données d'expression par cartes thermiques (heatmap) :

L'analyse précédente a permis de mettre en évidence des gènes qui ne sont pas induits ou réprimés chez *grxs17* par rapport à Col-0. Ces gènes agissent dans les différentes voies décrites plus haut. Un autre élément a également été observé chez le mutant : l'accumulation des mRNA de nombreux gènes induits suite à l'augmentation de la température, présente un retard par rapport à Col-0. Afin de visualiser ce délai, nous avons considéré l'expression des gènes de Col-0 surexprimés et sous-exprimés dans les 2 conditions et nous l'avons comparée à l'expression de ces mêmes gènes chez *grxs17*. Dans cette nouvelle analyse, nous avons décidé d'apposer un filtre afin d'éliminer les gènes peu induits ou réprimés en réponse au stress. Seuls les gènes surexprimés ayant un « fold change » supérieur à 2 et les gènes sous-exprimés ayant un « fold change » inférieur à 0,5 ont été conservés. A T2, 786 gènes sont surexprimés en réponse à l'augmentation de température et 384 gènes sont sous-exprimés et à T24, 238 gènes sont surexprimés et 134 gènes sont sous-exprimés. Ces données sont présentées sous forme de heatmap (Figures 59 et 60). Les heatmap ont été découpées en cluster numérotés de 1 à 5 pour les gènes surexprimés et de a à d pour les gènes sous-exprimés.

I.4.1 Etude des listes de gènes induits par l'augmentation de la température chez Col-0 et comparaison avec *grxs17* :

Chez Col-0, 786 gènes sont surexprimés après à 2h à 28°C (Figure 59A). Une grande partie de ces gènes retrouve un niveau d'expression équivalent à celui du T0 au bout de 24h puisque seulement 238 gènes sont surexprimés à T24.

Chez *grxs17*, l'expression de ces mêmes gènes est différente. Les 577 gènes du cluster 1 ne sont pas induits à T2 mais à T24 sauf certains qui ne sont pas induits du tout. Il y a donc un délai dans l'induction de ces gènes chez *grxs17*. Dans le cluster 2, qui contient les autres gènes, le délai est moins marqué et les profils d'expression de ces différents gènes sont hétérogènes. Une partie d'entre eux présentent le même profil que Col-0 et d'autres sont déjà surexprimés à T0. Le cluster 1 semble donc très intéressant puisque les profils d'expression des gènes diffèrent de Col-0. Nous avons recherché les fonctions, les processus et les composants cellulaires

Tableau 4 : Catégories significativement surreprésentées par les gènes du cluster 1 après l'usage des annotations GO.

Des annotations GO ont été effectuées sur la liste des 577 gènes du cluster 1 (surexprimés à 2h à 28°C). Les fonctions moléculaires, les processus biologiques, les composants cellulaires et les classes de protéines significativement surreprésentés avec une $p\text{-value} < 0,05$ sont présentés dans le tableau ci-dessus. Un test de surreprésentation (overrepresentation test) ID des gènes *vs* le génome entier d'*Arabidopsis thaliana* a été effectué. Un test exact de Fisher et une correction par calcul du faux taux de découverte ont été appliqués.

FONCTIONS MOLECULAIRES
Constituant structural ribosomique
Les liaisons dépendantes de l'ATP
Protéines aux activités sérine/thréonine kinase
Activité peptidase
PROCESSUS BIOLOGIQUES
Traduction
Protéolyse
Processus métaboliques des glucides
Phosphorylation des protéines
COMPOSANTS CELLULAIRES
Complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale
Complexe d'oxydoréductase
Petite et grande sous-unité ribosomale cytosolique
Complexe protéique de la membrane mitochondriale interne
noyau
CLASSES DE PROTEINES
Protéases
Protéines ribosomales
Pas classées

significativement impactés par l'augmentation de température. Pour cela, nous avons effectué des annotations GO sur les gènes du cluster 1 avec le système de classification Panther de geneontology (<http://pantherdb.org/>). Les résultats sont présentés dans le tableau 4. Des fonctions moléculaires, des processus biologiques, des composants cellulaires et des classes de protéines sont significativement surreprésentés pour les gènes du cluster 1. C'est le cas par exemple des gènes codant pour des protéines présentant une activité peptidase et des activités sérine/thréonine kinase (phosphorylation des protéines). Ce dernier élément est connu pour agir lors d'un stress thermique dans la transduction du signal (Mittler et al., 2012). La traduction est également surreprésentée avec des protéines ribosomales notamment la petite et grande sous-unité ribosomale. Cette voie n'est donc pas induite correctement chez *grxs17* à T2. Enfin, il y a le noyau, les processus métaboliques des glucides, des protéases puis des complexes d'oxydoréductases et la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces derniers éléments montrent donc que des voies métaboliques normalement induites lors d'un stress thermique (chez Col-0) comme les sucres et des acides aminés impliqués dans le cycle TCA ne sont pas induites correctement chez *grxs17* (Tableau 4) (Rizhsky et al., 2004). L'ensemble de ces éléments qui sont induits chez Col-0 ne sembleraient donc pas mis en place correctement chez *grxs17* en réponse à 2h à 28°C.

A T24, 238 gènes sont surexprimés par rapport à T0 chez Col-0 (Figure 59B). Parmi ces 238 gènes, nous retrouvons *VSP1*. Si nous nous focalisons sur la carte thermique, la moitié de ces gènes sont déjà surexprimés à T2 (cluster 3 et la majorité du 4) mais ce n'est pas le cas pour l'autre moitié (cluster 5). Les profils d'expression de ces gènes sont différents chez *grxs17*. Dans le cluster 3, la moitié d'entre eux ne sont pas exprimés à T2 comme chez Col-0 mais plutôt à T24, ils présentent donc un retard dans leur accumulation. De plus, ¼ sont sous-exprimés à T24 comme pour le cluster 4, alors que ¼ des gènes de ce cluster ont un profil d'expression identique à celui de Col-0. Pour finir, le cluster 5 regroupe les gènes qui sont surexprimés à T24 mais pour les ¾ d'entre eux avec des profils d'expression différents de ceux de Col-0 à T2 (les gènes sont exprimés chez *grxs17*). Nous avons également effectué des annotations GO sur les clusters 3 et 4 qui regroupent des gènes pour lesquels les expressions diffèrent des gènes de Col-0. Cependant, l'annotation GO n'a pas mis en évidence de catégories significativement surreprésentées.

I.4.2 Etude des gènes réprimés par l'augmentation de la température chez Col-0 et comparaison avec *grxs17* :

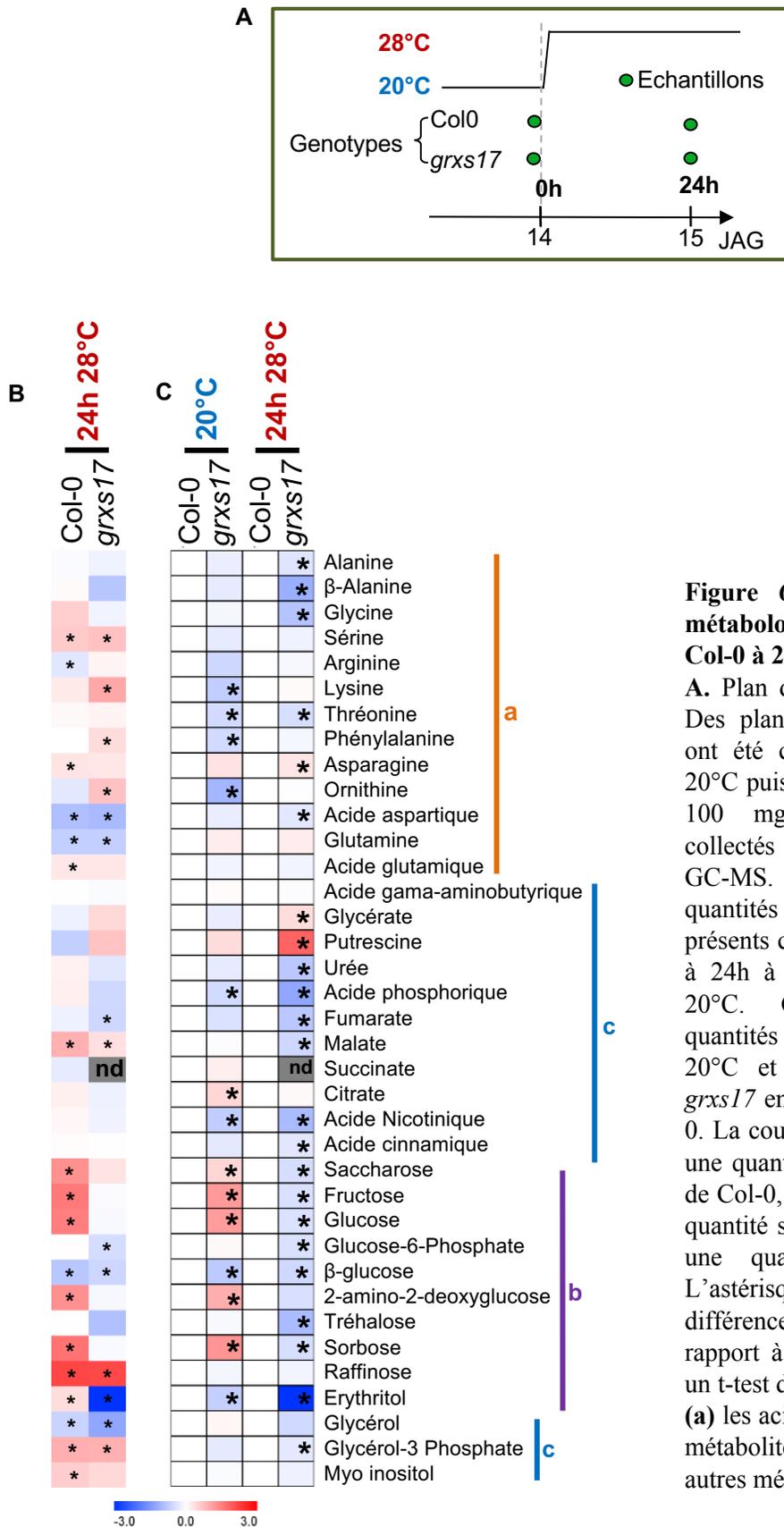
Ensuite, nous nous sommes intéressés aux gènes sous-exprimés en réponse à l'augmentation de la température. A T2, 384 gènes sont sous-exprimés chez Col-0 (Figure 60A). Le retard mis en évidence pour les gènes surexprimés est également observé chez *grxs17* pour les gènes sous-exprimés à T2 même s'il semble moins marqué que précédemment (Figure 59A). Les gènes, qui font partie du cluster a, sont globalement sous-exprimés à T24 alors que ce n'est plus le cas chez Col-0 (Figure 60A). Pour le cluster b, la majorité des gènes se comportent comme ceux de Col-0. *grxs17* présente donc également un délai dans la répression des gènes en réponse à 2h à 28°C. Nous avons réalisé de nouveau une annotation GO sur les gènes du cluster a (Tableau 5). De nombreux processus biologiques sont détectés dans cette analyse notamment des éléments du métabolisme comme la biosynthèse des disaccharides et du glucane, le saccharose, les acides α -aminés et aromatiques et les lipides.

A T24, 134 gènes sont sous-exprimés chez Col-0 (Figure 60B). Nous retrouvons la même tendance que chez Col-0 pour les gènes du cluster d chez *grxs17* mais ce n'est pas le cas pour la majorité des gènes du cluster c qui sont surexprimés. A noter que les profils d'expression des gènes à T2 chez *grxs17* diffèrent déjà légèrement de ceux de Col-0. Nous avons également effectué des annotations GO avec les gènes du cluster c mais celles-ci n'ont pas mis en évidence de catégories significativement surreprésentées. Pour conclure, l'ensemble de ces données montre que *grxs17* présente un retard dans l'induction et la répression des gènes en réponse à 2h et 24h à 28°C.

Tableau 5 : Catégories significativement surreprésentées par les gènes du cluster a après l'usage des annotations GO.

Des annotations GO ont été effectuées sur la liste des 305 gènes du cluster a (surexprimés 24h à 28°C). La fonction moléculaire, les processus biologiques et les composants cellulaires significativement surreprésentés avec une p-value < 0,05 sont présentés dans le tableau ci-dessus. Un test de surreprésentation (overrepresentation test) ID des gènes vs le génome entier d'*Arabidopsis thaliana* a été effectué. Un test exact de Fisher et une correction par calcul du faux taux de découverte ont été appliqués.

FONCTION MOLECULAIRE
Activité catalytique
PROCESSUS BIOLOGIQUES
Régulation négative de la voie de signalisation activée par les cytokinines
Processus catabolique de la famille des acides aminés aromatiques
Homéostasie des anions
Régulation du processus métabolique de la chlorophylle
Processus de biosynthèse des disaccharides
Processus métabolique du saccharose
Processus catabolique des acides α-aminés
Processus de biosynthèse du glucane
Réponse à l'acide jasmonique
Biosynthèse d'acide carboxylique
Réponse aux substances inorganiques
Processus métaboliques des lipides
Processus d'oxydoréduction
COMPOSANTS CELLULAIRES
Stroma chloroplastique
Périphérie cellulaire
Membrane
Organites intracellulaires non liés à la membrane
Pas classés



II. Analyse métabolomique de *grxs17* à 20°C et à 28°C :

Au vu des résultats de transcriptomique mettant en évidence des voies métaboliques dérégulées, une analyse métabolomique a été effectuée dans les mêmes conditions expérimentales que l'analyse transcriptomique à T0 et à T24 chez *grxs17* et Col-0 (Figure 61A). Le métabolome du stress thermique est assez peu étudié à 28°C mais certaines études réalisées lors de températures plus élevées sont disponibles. Par exemple, après un stress thermique de 6h à 38°C, un grand nombre de métabolites sont en plus grande quantité chez Col-0 par rapport à des plantes non stressées (20°C) (Rizhsky et al., 2004). Parmi eux, on retrouve des acides organiques (acide citrique, acide malique...), des acides aminés (β -alanine, cystéine, glycine, lysine...) et des sucres (glucose fructose, maltose, tréhalose...). L'analyse du métabolome à 28°C a été réalisée en collaboration avec Danilo Daloso et Alisdair R. Fernie du laboratoire Max Plant Institute of Molecular Plant Physiology (Golm, Allemagne). Les résultats sont représentés sous différentes formes dans les Figures 61, 62 et 63. La première « heatmap » montre l'évolution des quantités de métabolites pour Col-0 et *grxs17* après un traitement thermique de 24h à 28°C par rapport à T0 (Figure 61B). La seconde heatmap représente la comparaison entre *grxs17* et Col-0 à T0 et T24 (Figure 61B). Le graphe de la Figure 62 révèle le contenu en métabolites dans les plantules de Col-0 et *grxs17*. Enfin, les données à T24 ont été ajoutées sur une figure représentant la synthèse de ces différents métabolites et leur utilisation chez les plantes (Figure 63). L'hydrolyse du saccharose va libérer du fructose et du glucose, ce dernier étant important dans la glycolyse qui a pour produit le pyruvate utilisé dans le cycle TCA qui est situé dans la mitochondrie (Figure 63). Ces deux grandes réactions vont générer tout un ensemble de métabolites notamment les acides aminés. En réponse à l'augmentation de la température, Col-0 augmente significativement les quantités de certains métabolites sucrés comme le saccharose, le fructose, le glucose, le 2-amino-2-deoxyglucose, le sorbose, le raffinose et l'érythritol à l'inverse du β -glucose (Figure 61B et 63). Les quantités de certains acides aminés augmentent significativement comme la sérine, l'asparagine et l'acide glutamique et d'autres diminuent tels que l'arginine, l'acide aspartique et la glutamine. Enfin, le malate qui est un composé organique du cycle de Krebs augmente significativement à T24.

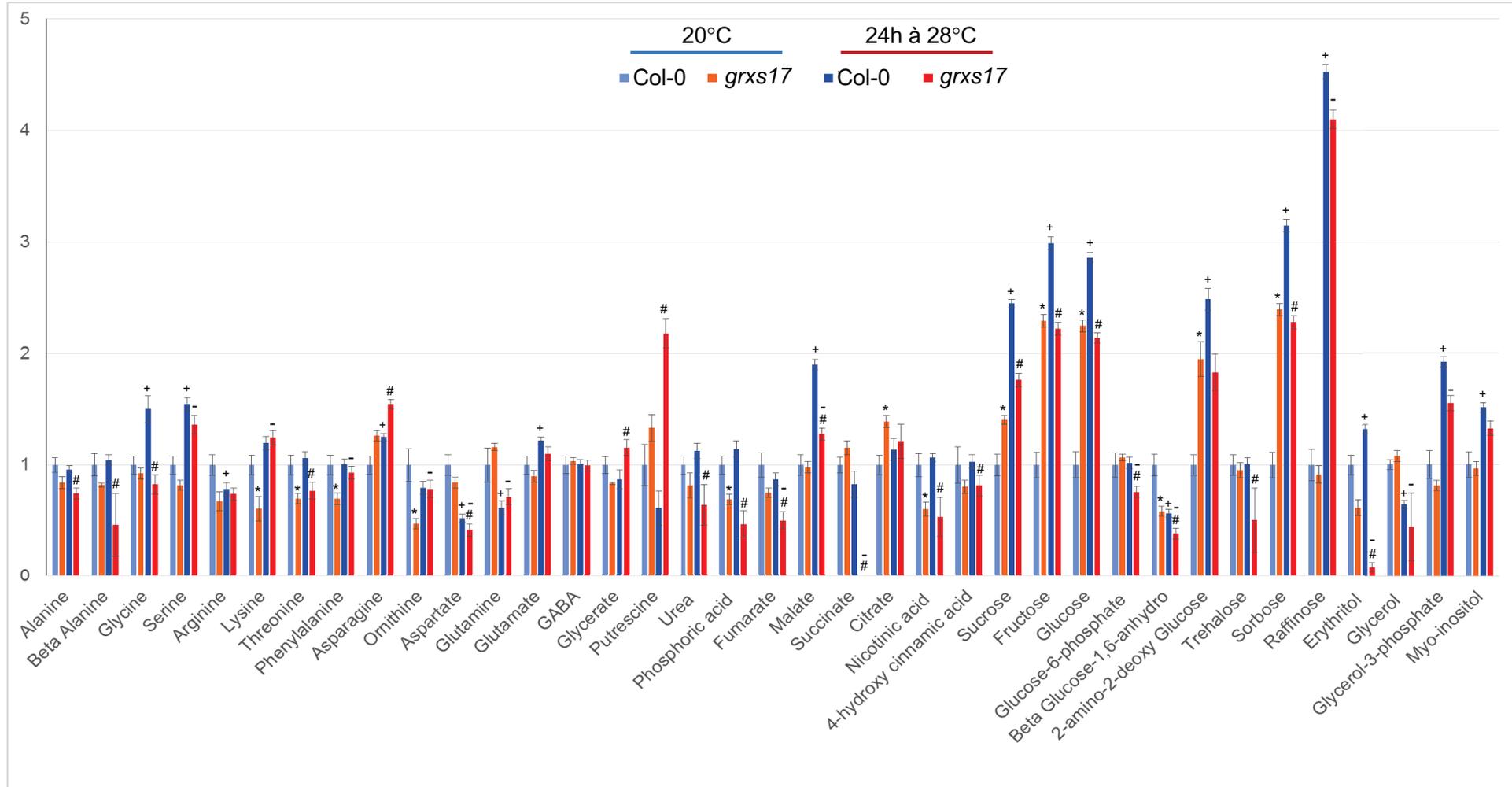


Figure 62 : Représentation graphique du contenu en métabolites des plantes Col-0 et grxs17 à 20°C et après un traitement de 24h à 28°C.

Les résultats sont normalisés par rapport à l'échantillon T0 de Col-0. Des t-test de Student ont été réalisés sur les données et des p-value inférieures à 0,05 sont représentées par les symboles suivants: *, comparaison grxs17 vs Col-0 à T0; #, comparaison grxs17 vs Col-0 à T24; +, comparaison T24 vs T0 dans Col-0; -, comparaison T24 vs T0 dans grxs17.

Un certain nombre de métabolites sucrés sont significativement présents en plus forte quantité à T0 chez le mutant comme le saccharose, le fructose, le glucose, le glucosamine et le sorbose (Figures 61C et 62). Cependant, à T24, ces mêmes métabolites sont présents en plus petite quantité que Col-0 et c'est aussi le cas pour le glucose-6-P et le tréhalose (Figure 61B et C, 62 et 63). Ensuite, le bêta-glucane et l'érythritol sont en quantité plus faible à T0 et à T24 (Figure 62). Si on se focalise sur les données, le saccharose, le fructose, le glucose, le glucosamine et le sorbose sont présents en quantités sensiblement équivalentes chez *grxs17* à T0 et à T24 alors que chez Col-0 leur quantité augmente entre les deux conditions (Figure 62). Par exemple, à T0, la quantité de glucose et de fructose chez *grxs17* est 2,3 fois plus grande que Col-0 et celle du saccharose est, quant à elle, 1,4 fois plus élevée que Col-0. De plus, dans le transcriptome, le processus métabolique des glucides qui est induit chez Col-0, est retardé chez *grxs17*. Ces données suggèrent un défaut dans la gestion des métabolites sucrés chez *grxs17*. En effet, les quantités de certains d'entre eux sont supérieures à celles de Col-0 dans des conditions normales et n'augmentent pas en réponse à 24h à 28°C. Ceci va impacter la glycolyse, le cycle TCA et la production des acides aminés.

Plusieurs acides aminés sont significativement présents en quantité plus faible à 20°C chez le mutant en comparaison avec Col-0 comme la lysine, la thréonine, la phénylalanine et l'ornithine (Figure 61C). A 24h à 28°C, la thréonine, qui provient de l'oxaloacétate (non mesuré) est toujours en quantité significativement plus faible à l'inverse des trois autres (Figures 61B et C, 62 et 63). De plus, l'alanine, la β -alanine, la glycine et l'acide aspartique sont présents en quantités significativement plus faibles chez *grxs17* par rapport à Col-0. A l'inverse, l'asparagine est en quantité plus grande chez *grxs17*. Fait intéressant, la putrescine, métabolite produit par la dégradation des acides aminés est présente en quantité plus importante chez *grxs17* à T0 et de manière très significative à T24 (Figures 62B et C, 63 et 64). J'aimerais rappeler que les résultats d'annotation GO faites sur les 305 gènes sous-exprimés du cluster a, mettent en évidence des gènes représentés significativement dans le métabolisme des acides aminés (Tableau 5). Les acides aminés constituent la base des protéines et des quantités plus faibles d'acides aminés chez *grxs17* suggèrent une diminution de la production de protéines notamment en réponse à la température.

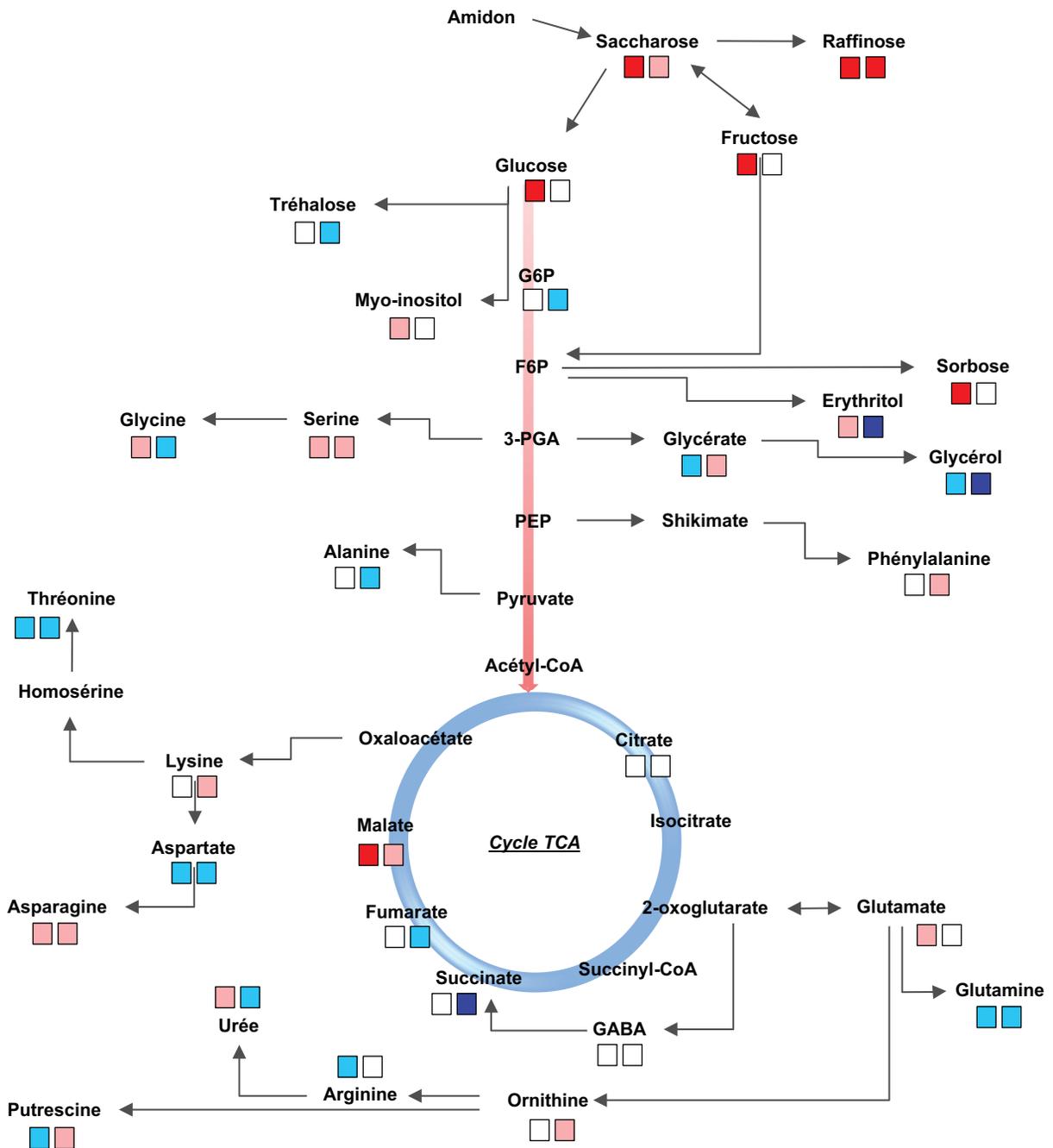


Figure 63 : Les contenus en métabolites de Col-0 et *grxs17* 24h à 28°C remplacés dans les différents processus métaboliques de la plante.

Les niveaux d'augmentation (rouge et rose) ou de diminution (bleu foncé et bleu clair) après traitement de 24h à 28°C sont représentés par des carrés. Carré de gauche, plantes sauvage. Carré de droite, mutant *grxs17*. La flèche rouge représente la glycolyse. **G6P**, Glucose-6-Phosphate. **F6P**, Fructose-6-Phosphate. **3-PGA**, Glyceraldehyde-3-Phosphate. **PEP**, Phosphoenol-pyruvate. **GABA**, Acide γ -aminobutyrique.

Enfin, les autres métabolites comme les acides organiques ont aussi une quantité diminuée chez le mutant (Figures 61, 62 et 63). A T0 et à T24, l'acide phosphorique est en quantité significativement plus petite chez *grxs17* que chez Col-0 (Figure 61C). C'est aussi le cas pour l'urée, l'acide cinnamique, le fumarate et le malate à T24, les deux derniers étant impliqués dans le cycle TCA (Figures 61C, 62 et 63). Les quantités de citrate et de glycérate sont significativement plus élevées que Col-0 à respectivement T0 et T24 (Figure 61C et 62). Enfin, l'acide nicotinique, un précurseur du NAD^+ et NADP^+ , qui est nécessaire comme cofacteur d'oxydoréduction au métabolisme des glucides, des lipides et des protéines est en quantité significativement plus faible chez *grxs17* (Figure 62C et 63). Les moindres quantités de ces métabolites qui sont notamment impliqués dans le cycle de TCA suggèrent que le mutant est impacté dans la production d'énergie.

Les résultats montrent des niveaux dérégulés en acides aminés, en putrescine, en composés organiques et en métabolites sucrés dans *grxs17* en comparaison avec Col-0 notamment en réponse au stress thermique ce qui concorde avec les observations précédentes.

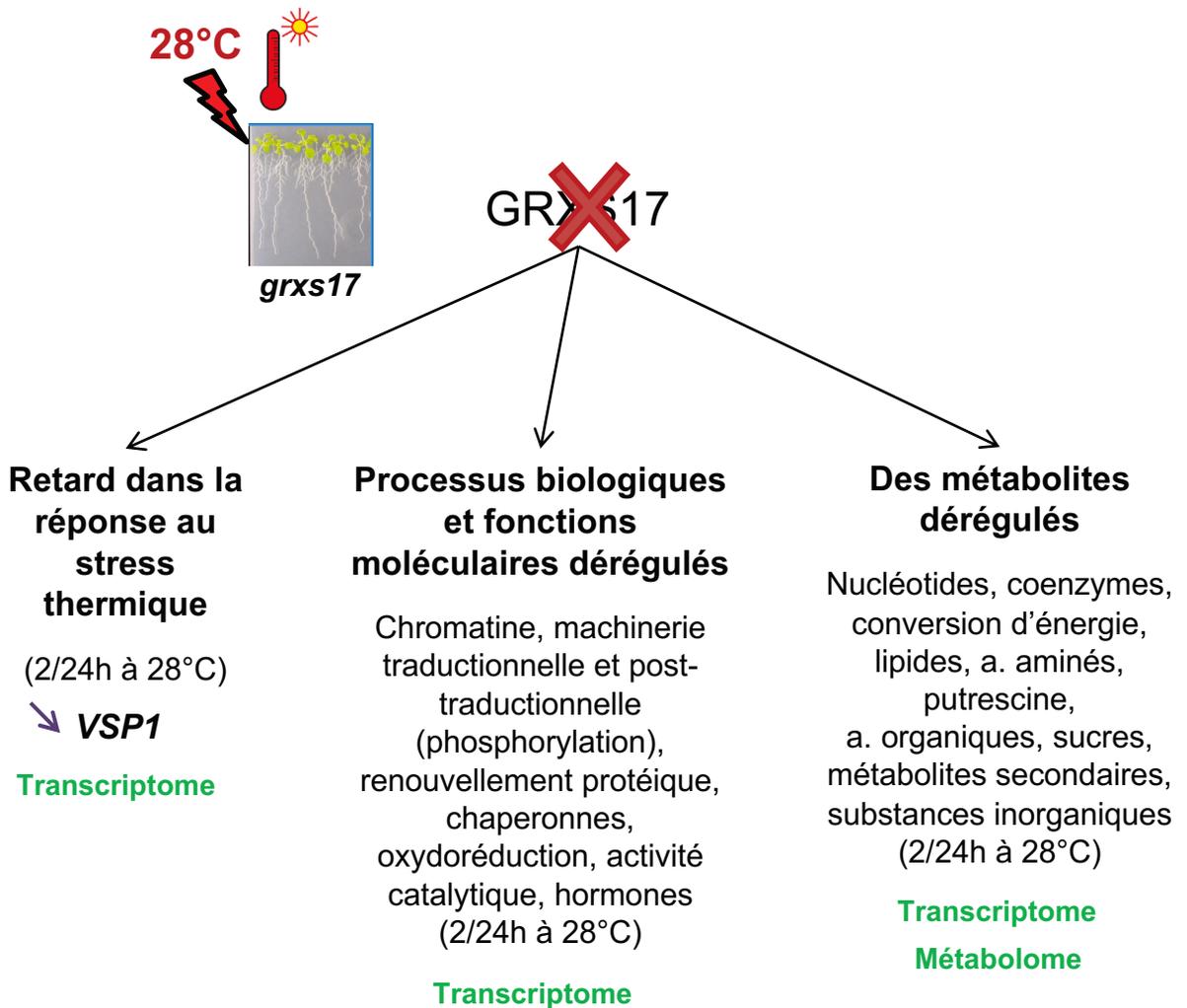


Figure 64 : Le transcriptome et le métabolome de *grxs17* sont dérégulés par rapport à Col-0 lors d'un stress thermique à 28°C.

VSP1 est sous-exprimé dans *grxs17* à 20°C, 2h et 24h à 28°C. Trois gènes de la HSR sont plus exprimés dans le mutant 24h à 28°C, il s'agit d'*HSP70*, d'*HSP90* et d'*APX2*. Deux gènes répondant à l'acide jasmonique comme *VSP1*, *PDF1.2* et *PDF1.3*, sont moins exprimés dans *grxs17* par rapport à Col-0 et deux gènes importants dans l'organisation de la chromatine *HTA9* et *HTA12* sont à l'inverse plus exprimés. Face au stress thermique, *grxs17* présente un retard de réponse par rapport à Col-0. Plusieurs éléments de la cellule sont impactés comme les protéines liées à la chromatine, la machinerie traductionnelle et post-traductionnelle (phosphorylation), le renouvellement protéique, les protéines les chaperonnes, les réactions d'oxydoréduction, l'activité catalytique et les hormones. C'est également le cas du métabolisme et des métabolites comme les nucléotides, les coenzymes, la conversion d'énergie, les lipides, les acides aminés, la putrescine, les acides organiques, les métabolites sucrés, secondaires et les substances inorganiques.

DISCUSSION

La réponse transcriptomique et métabolomique de *grxs17* sont dérégulées par rapport à Col-0 lors d'un stress thermique à 28°C (Figure 64). Face au stress thermique, la réponse transcriptionnelle de *grxs17* est retardée par rapport à Col-0. De plus, *VSP1* est sous-exprimé dans *grxs17* par rapport à Col-0 dans les trois conditions. Plusieurs éléments de la cellule sont impactés comme les protéines liées à la chromatine, la machinerie traductionnelle et post-traductionnelle, le renouvellement protéique, les protéines chaperonnes et la réponse hormonale dépendant de l'acide jasmonique et des cytokinines. C'est également le cas pour les métabolites comme les nucléotides, les coenzymes, la conversion d'énergie, les lipides, les acides aminés, la putrescine, les acides organiques, les métabolites sucrés et secondaires.

I. La réponse à l'augmentation à la température est dérégulée et retardée chez *grxs17* :

VSP1 (Vegetative Storage Protein 1) fait partie des deux gènes significativement communs aux trois conditions (Figure 55D). *VSP1*, est un gène codant pour une phosphatase homologue à une protéine de stockage végétatif chez le soja (Shi et al., 2010). Il a été suggéré que ce gène aurait un rôle dans le stockage temporaire de réserves (fortes homologies avec les VSPs du soja) et qu'il agirait dans le développement de la plante par son activité phosphatase. Il a été montré que le complexe VSP1-FLOR1 interagirait directement avec AGAMOUS dans le développement du carpelle et des étamines lors de la floraison (Gamboa et al., 2001). GRXS17 est aussi très exprimé dans la fleur notamment dans le carpelle (Figure 28). Il semblerait donc que VSP1, par sa forte homologie avec les VSPs de soja, soit impliquée dans le développement et la croissance de la plante. Dans le mutant *grxs17* on observe une diminution de l'expression de VSP1 en conditions normales de croissance ou lors d'un stress thermique court (2h ou 24h à 28°C). L'interaction entre VSP1 et GRXS17 devra être confirmée puisque nous n'avons pas observé cela dans les IPs (chapitre 2). Pour éclaircir cette relation, plusieurs analyses complémentaires seront nécessaires. Nous pourrions par exemple, étudier le mutant *vsp1*, et mettre en place un double mutant *vsp1grxs17* pour savoir s'ils agissent ou pas dans la même

voie (phénomène d'épistasie). Enfin, pour savoir si ces deux protéines interagissent, du BiFC dans la plante ou des essais de double hybride en levure pourraient être mis en place.

Le facteur du choc thermique HSF A8 est retrouvé dans les gènes différentiellement exprimés à T24 entre Col-0 et *grxs17* puisque son expression est significativement 3 fois supérieure dans ce dernier. HSF A8 subit une régulation redox dépendante des cystéines pour sa translocation dans le noyau (Giesguth et al., 2015; Martins et al., 2018). Ceci va lui permettre d'agir en tant que potentiel activateur de l'induction des facteurs de transcription *ZAT10* et *ZAT12*. Ces deux gènes vont induire *APX1* et *2* afin de détoxifier la cellule des excès d' H_2O_2 . Une accumulation plus importante d' H_2O_2 dans les racines et dans les faisceaux vasculaires a été détectée à 28°C dans le *grxs17* par rapport à Col-0 (Cheng et al., 2011a). Si tel est le cas lors d'un stress thermique à 28°C, les expressions relatives plus élevées d'*HSFA8* et d'*APX2* dans *grxs17* pourraient en être la conséquence afin de diminuer la quantité d' H_2O_2 .

Un élément intéressant qui a été mis en évidence par les annotations COG est la proportion de protéines chaperonnes qui sont plus grande chez *grxs17* à T2 (Figures 56 et 57). Nous avons montré que GRXS17 était une protéine chaperonne redox-dépendante probablement en lien avec la réponse au stress thermique et à la thermotolérance. Ces nouvelles données montrent qu'en absence de GRXS17, il y a plus de protéines chaperonnes qui sont induites à T2 (Figures 56 et 57). Nous pouvons donc supposer que l'absence de GRXS17 serait palliée par une induction d'autres protéines chaperonnes. Ensuite, les processus d'oxydoréduction sous-exprimés et les complexes d'oxydoréductases surexprimés chez Col-0 apparaissent dans ces analyses comme retardés chez *grxs17* (Figures 59 et 60 et Tableaux 4 et 5). GRXS17 fait partie des GRXs qui sont des enzymes présentant, pour la plupart, une activité de réduction de ponts disulfures et de déglutathionylation (se référer à la partie V. de l'introduction). A ce jour, nous n'avons démontré aucune activité efficace de réduction de ponts disulfures pour GRXS17 mais des auteurs ont montré que GRXS17 était capable de réduire BOLA2 *in vitro* (Couturier et al., 2014). Une autre catégorie qui est mise en avant dans nos analyses est la réponse à l'acide jasmonique (Tableau 5). *VSP1* répond à cette hormone et dans la littérature, ce lien entre GRXS17 et l'acide jasmonique a déjà été testé (Nagels et al., 2016). Les auteurs ont montré que GRXS17 interagissait avec RGLG3 et RGLG4 qui sont des E3 ubiquitines ligases. Ces deux

protéines sont suggérées agir comme modulateurs en amont de la signalisation de l'acide jasmonique en réponse à des stimulus variées (Zhang et al., 2012, 2015). Seulement, RGLG3, RGLG4 et GRXS17 n'ont pas été montrées comme essentielles à la voie de signalisation de l'acide jasmonique (Nagels Durand et al., 2016). L'acide jasmonique inhibe la croissance des racines donc un excès de ce dernier dans *grxs17* pourrait expliquer les défauts de croissance. Pourtant, ce n'est pas le cas car aucun des gènes connus pour répondre au JA n'est régulé positivement dans *grxs17*, même après une courte incubation au JA (Nagels Durand et al., 2016). Le lien entre GRXS17 et l'acide jasmonique ne semble pas très clair, des investigations complémentaires seraient nécessaires. Enfin, d'autres gènes induits chez Col-0 mais avec du retard chez *grxs17* produisent des protéines impliquées dans la phosphorylation (Tableau 4). Cette modification post-traductionnelle est très importante puisqu'elle permet d'activer ou d'inactiver certaines protéines comme des enzymes ou des récepteurs. Elle permet notamment la transduction du signal par la voie des MAPK comme cela a été décrit dans la perception du stress thermique dans la partie III de l'introduction. Des protéines kinases ont été retrouvées dans les IPs à 20°C et à 35°C ce qui complète ces observations (Tableaux 1 et 2).

II. La réponse métabolomique face à l'augmentation de la température est dérégulée chez *grxs17* :

L'annotation GO sur les listes de gènes des « heatmap », et le métabolome montrent une dérégulation dans le métabolisme des sucres (Figures 61-63 et Tableaux 4 et 5). Les données du métabolome montrent des quantités plus grandes de saccharose, de fructose et de glucose chez le mutant à 20°C mais qui n'augmentent pas en réponse à la température (Figure 62). Nous pouvons supposer que le mutant n'est plus capable d'induire correctement les gènes liés au métabolisme des sucres notamment ceux en faveur de la croissance. Une cible/partenaire potentiel(le) de GRXS17 dans le métabolisme du sucre pourrait être ASUS1, une sucrose synthase qui synthétise une molécule de saccharose à partir d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose et qui a été identifiée parmi les partenaires hypothétiques de GRXS17 (Knuesting et al., 2015). Dans le transcriptome, les données d'expression de ce gène sont plus élevées chez *grxs17* par rapport à Col-0 ce qui montre que l'absence de GRXS17 impacte l'expression de ce gène.

Les résultats des annotations COG et GO et le métabolome mettent en évidence une dérégulation au niveau du métabolisme des acides aminés (Figures 61-63, Tableaux 4 et 5). Les quantités de la plupart des acides aminés sont moins élevées chez *grxs17* par rapport à Col-0. A l'inverse, la concentration de putrescine, métabolite produit par la dégradation des acides aminés augmente. Ceci suggère que cette différence de quantité est peut-être due à une dégradation accrue des acides aminés chez le mutant. Les quantités plus petites des sucres notamment de fructose et glucose pourraient expliquer ces quantités plus faibles d'acides aminés (Figures 62 et 63). En effet, la glycolyse va permettre la production de certains acides aminés et de pyruvate, ce dernier étant un précurseur du cycle TCA. La diminution du pyruvate va impacter ce cycle et notamment la production d'acides aminés et d'énergie pour la cellule. Les quantités de certains composés organiques de ce cycle ont été mesurées ce qui montre qu'elles sont également diminuées chez *grxs17* face à l'augmentation de la température (Figures 61-63). Les autres métabolites précurseurs ou produits dans le cycle TCA comme le pyruvate et le 2-oxoglutarate n'ont pas été mesurés.

Les métabolites ont été montrés pour influencer la réduction ou l'oxydation de ces enzymes. Par exemple, l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), une enzyme clé de la synthèse d'amidon est rapidement activée sous illumination *via* la réduction d'un pont disulfure intramoléculaire par une TRX (Hendriks et al., 2003; Kolbe et al., 2005). L'activation est également favorisée par les sucres, qui agissent en addition de la lumière. Plus récemment, une étude a montré une relation entre des molécules anti-oxydantes, l'ascorbate (AsA), le glutathion (GSH) et la quantité d'acides aminés libres (Gulyás et al., 2017). La quantité de certains acides aminés libres augmente dans les mutants déficients en AsA et GSH et après un traitement H₂O₂. Ces données suggèrent encore une fois une régulation redox des acides aminés. Enfin, l'acide nicotinique, un précurseur du NAD⁺ et NADP⁺ est en quantité significativement plus petite chez *grxs17* ce qui va impacter les voies de réduction (Figures 62C et 63). Il y a donc plusieurs évidences que les thiols et les métabolites sont liés. Différentes voies des métabolites apparaissent comme dérégulées ou diminuées dans le mutant en réponse à la température. Nous pouvons donc imaginer que certaines de ces enzymes ne sont pas activées et/ou inactivées correctement chez *grxs17* en réponse à l'augmentation de la température. GRXS17 semble donc liée à ces voies métaboliques et pourrait agir directement ou indirectement sur ces enzymes. Il est évident que plusieurs études complémentaires sont nécessaires pour valider ce lien entre

GRXS17 et les métabolites. En particulier, il sera intéressant de mesurer les flux métaboliques par l'analyse de la redistribution du carbone marqué dans différents métabolites après des traitements des plantes par des métabolites radioactifs. Il pourrait aussi être envisagé de mesurer les activités d'enzymes métaboliques (e.g. des enzymes de la glycolyse et du cycle TCA) dans le mutant *grxs17*.

Pour conclure, le transcriptome et le métabolome de *grxs17* sont dérégulés, la réponse transcriptomique est retardée et les métabolites sont globalement plus faibles que chez Col-0. GRXS17 est-il un senseur du stress thermique ?

DISCUSSION GENERALE

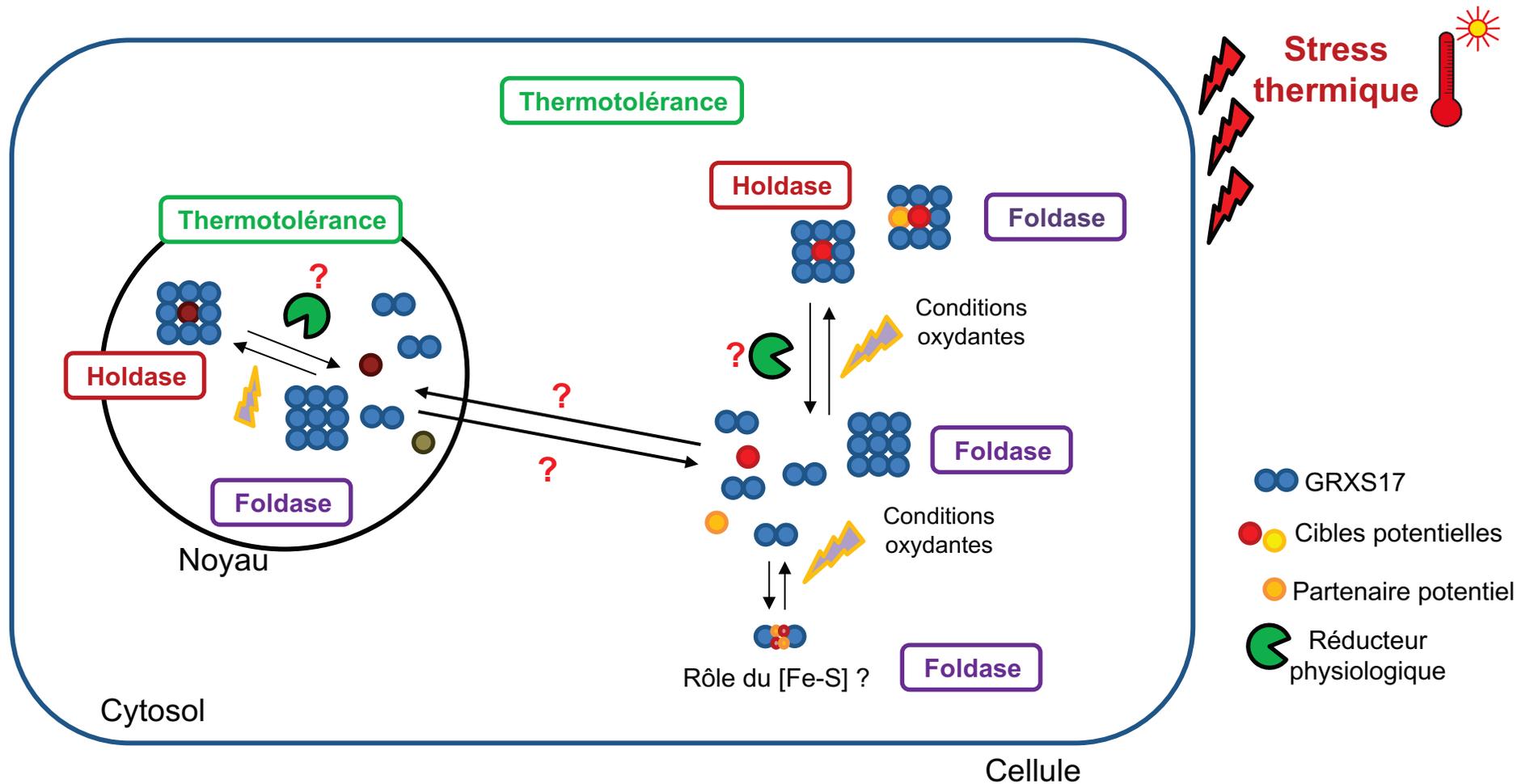


Figure 65 : Modèle bilan.

La protéine chaperonne GRXS17 (sphère bleue) est sous la forme de dimères (avec ou sans cœurs Fe-S) et d'oligomères (ponts disulfures et/ou liaisons faibles) dans la cellule où elle exerce une activité foldase. Son changement de forme (LMW vers HMW) est lié à la perte de ses cœurs Fe-S lors de conditions oxydantes (éclair jaune) ce qui entraîne un « switch » de fonction vers une activité holdase. Ces oligomères pourraient être des homodimères ou des hétérodimères composés de cibles à protéger et/ou de partenaires liés à ses activités. Parmi les cibles et/ou partenaires candidats, nous retrouvons BOLA2 et HSP70 qui ont été identifiées dans nos approches d'IPs. Un réducteur inconnu (forme verte) réduirait la forme oligomérique composée de ponts disulfures. Son rôle dans la thermotolérance pourrait être lié à ses activités de chaperonne lors d'un stress thermique et pourrait être accompagné d'une fonction nucléaire et d'une potentielle relocalisation au noyau.

DISCUSSION GENERALE

I. GRXS17 est un acteur de la croissance de la plante :

L'ensemble des résultats permet d'approfondir et de confirmer le rôle de GRXS17 dans la croissance de la plante à des températures normales et cela à plusieurs stades de développement (Figure 65). Par exemple, nos analyses sur la racine montrent clairement un rôle de GRXS17 dans le MAR. La zone méristématique plus petite du mutant, avec moins de cellules en division rappelle les observations faites précédemment dans les méristèmes apicaux dans lesquels le nombre de cellules souches est réduit par rapport aux plantes sauvages (Knesting et al., 2015). De manière analogue aux méristèmes apicaux, le MAR ne subit pas de perturbations profondes de sa structure. Cela suggère que GRXS17 n'a pas un rôle essentiel dans le fonctionnement méristématique comme cela a été montré pour des facteurs de transcription tels que WUS et WOX5 ou dans le mutant de biosynthèse de glutathion *rml1* (se référer à la partie I.2 de l'introduction) (Vernoux et al., 2000). Il est d'ailleurs intéressant de noter que le défaut de croissance racinaire du mutant *grxS17* peut être partiellement réversé par un ajout exogène de glutathion dans le milieu de culture, sans qu'une explication très claire ne puisse être donnée pour l'instant (résultats non montrés). D'autre part, de nombreux facteurs peuvent être responsables des perturbations d'activité du MAR et cela nécessiterait d'autres expériences. On peut imaginer que GRXS17 serait impliquée dans la régulation ou la protection d'une/de protéine(s) importantes pour l'activité méristématique ou la division cellulaire. Les recherches d'interactants de GRXS17 présentées au chapitre 2 ne permettent pas de dégager pour l'instant un candidat potentiel dans les méristèmes, parce que vraisemblablement les expériences ont été effectuées sur des plantules entières. Des immunoprécipitations effectuées sur des méristèmes seraient envisageables mais poseraient des problèmes techniques de quantités de protéines.

Les phénotypes du mutant *grxs17* sont bien plus marqués à des températures de culture plus élevées. A 28°C, le MAR a une structure perturbée et présente des symptômes de mort cellulaire, ce qui n'est pas le cas à température normale (20°C). On peut se demander si l'augmentation de température exacerbe le phénotype du mutant, par exemple par le fait que la température élevée provoque un stress oxydatif plus intense dans la plante. Le fait que le mutant

grxs17 ne soit pas hypersensible au stress oxydatif ne soutient pas cette hypothèse (résultats non montrés). Une autre hypothèse serait que GRXS17 a une fonction différente à températures élevées. Plusieurs arguments tirés de mes résultats vont dans ce sens : (a) les perturbations phénotypiques à différentes températures, en particulier la mise en place d'une mort cellulaire dans les méristèmes (b) la mise en place d'une activité holdase dépendante de l'oxydation et de la température (c) le jeu de partenaires différents à température normale et à température élevée (d) la modification du transcriptome et du métabolome à 28°C. En effet, après 24 h de traitement à 28°C, j'ai observé des modifications importantes de l'accumulation de métabolites dans les plantes sauvages. En particulier, différents sucres, acides aminés et acides organiques liés au cycle TCA s'accumulent après le stress. Ces changements suggèrent des modifications de flux métaboliques et énergétiques en réponse au stress thermique. De manière intéressante, ces ajustements métaboliques n'interviennent pas dans le mutant *grxs17*. Un déficit métabolique et énergétique pourrait expliquer les phénotypes de croissance et l'activité méristématique ralentie dans les mutants. Il sera intéressant de confirmer ces données en mesurant les flux métaboliques de la glycolyse et du cycle TCA par incubation de plantes avec des métabolites marqués.

Mes expériences de complémentation du mutant *grxs17* par différentes versions de GRXS17 ont montré aussi des différences marquées à température normale et à températures élevées. Par exemple, la lignée adressée au noyau par l'ajout d'un NLS complémente la thermotolérance (TMHT) alors qu'elle est bien moins efficace dans le développement de la racine à température normale. Le rôle de la première cystéine du domaine TRX a un rôle majeur sur la croissance à 20°C et à 28°C alors que sa mutation n'a aucun impact sur la thermotolérance (TMHT). Un autre exemple est la complémentation par GRXS14 qui, lorsqu'elle est localisée dans le cytosol, complémente la croissance à température normale et la TMHT. Ceci suggère qu'un seul domaine GRX peut remplacer GRXS17 autant dans sa capacité à se localiser dans les deux compartiments cellulaires (cytosol/noyau) et qu'interagir avec des partenaires de GRXS17. L'absence de complémentation avec la construction ne comprenant que le premier domaine TRX de GRXS17, confirme qu'un domaine GRX est nécessaire et/ou suffisant pour les fonctions physiologiques de la protéine. Ces données soulignent l'importance de la localisation ainsi que des résidus Cys et des domaines de GRXS17 dans la fonction de la protéine. Pour élucider le lien structure-fonction de GRXS17, des essais de cristallisation ont été tentés en

collaboration avec le groupe de Joris Messens. Malgré l'obtention de quasi-cristaux, ces essais n'ont pour l'instant pas abouti.

II. GRXS17 est une protéine chaperonne redox-dépendante :

Lors de ces travaux de thèse, nous avons identifié une nouvelle fonction de la GRXS17, il s'agit d'une fonction chaperonne (Chapitre 2). Des conditions oxydantes dans la cellule peuvent être causées par l'augmentation de ROS intracellulaires notamment lors d'un stress thermique (se référer à la partie III. de l'introduction) (Mittler et al., 2012). Nous avons montré que GRXS17 possédait une activité foldase et une activité holdase et que cette dernière était acquise par la perte des cœurs Fe-S en conditions oxydantes et de stress thermique (Figure 5 de l'article et Figure 65). Ceci s'accompagne d'un passage d'un faible poids moléculaire (LMW) vers un plus haut poids moléculaire (HMW_oligomérisation). Ce changement de taille est dépendant des cystéines des sites actifs puisque lorsqu'elles sont mutées, GRXS17 perd sa capacité à s'oligomériser. L'activité holdase est donc dépendante d'une oxydation et d'une oligomérisation *via* ses cystéines. Ce « switch redox » dans l'activité chaperonne provoqué par l'H₂O₂ a déjà été montré pour certaines chaperonnes comme l'HSP33 et plus récemment pour l'HSP70 (Jakob et al., 1999; Hanzén et al., 2016). La combinaison de l'H₂O₂ et de la chaleur vont permettre d'activer l'HSP33 (Jakob et al., 1999; Kumsta and Jakob, 2009). Chez la levure, l'hydroxydation de la peroxyrédoxine Tsa1 par l'H₂O₂ va être nécessaire pour le recrutement de l'HSP70 et d'HSP104 pour la désagrégation des protéines lors du vieillissement (Hanzén et al., 2016). Mes résultats montrent, pour la première fois, qu'une protéine à cœur Fe-S acquiert des capacités chaperonnes en conditions de stress. Ici, le cœur Fe-S est une structure régulatrice de ces fonctions. De plus, les expériences avec des protéines mutées sur les cystéines catalytiques suggèrent qu'elles sont impliquées dans la coordination des clusters et dans les activités chaperonnes. Lors de la perte du cluster, on peut se demander si des modifications structurelles interviennent et si celles-ci induisent des changements de conformation ainsi que des modifications de l'hydrophobicité de la protéine. Les modifications des profils de dichroïsme circulaire que l'on a observés pourraient être un indicateur de ces modifications. Une expérience complémentaire serait d'étudier l'hydrophobicité de la protéine après perte du cluster. Ces modifications pourraient être impliquées dans l'établissement d'oligomères de

GRXS17 *via* des interactions non-covalentes et/ou covalentes. Mais ces modifications pourraient également être responsables des interactions avec des partenaires. Mes résultats d'immunoprécipitation avant et après stress thermique montrent un changement important de l'identité des interactants, pouvant être lié à cette modification structurale. Il est connu que, lors d'un stress thermique, des modifications de conformation des protéines exposent des régions hydrophobes (voir introduction). Il serait intéressant d'étudier si les partenaires identifiés de GRXS17 subissent de telles modifications. Des résultats préliminaires suggèrent que dans le mutant *grxs17*, une plus grande proportion de protéines est retrouvée sous forme d'agrégats (résultats non montrés). Les protéines foldases sont impliquées dans le repliement de protéines nouvellement synthétisées ou bien de celles qui sont partiellement dépliées à la suite d'un stress (Hartl et al., 2011). GRXS17 pourrait donc être impliquée dans ces deux mécanismes. En effet, contrairement à l'activité holdase, l'activité foldase de GRXS17 est constitutive (avec ou sans cluster). L'association identifiée de GRXS17 avec des protéines ribosomales (ATL5 et RPS7B) par des IP à 20°C, pourrait suggérer un lien avec le repliement de protéines lors de leur néosynthèse.

Des rédoxines ayant un rôle de chaperonne ont été décrites, mais c'est la première fois qu'une GRX de plante présente cette fonction (se référer à la partie **III.3.2.3.2** de l'introduction). Parmi ces exemples, on retrouve la chaperédoxine CnoX d'*E.Coli*, les 2-Cys Per, la thiorédoxine TRXh3, l'AtNTRC et l'AtTDX (Goemans et al., 2018; Kumsta and Jakob, 2009; Park et al., 2009a; Chae et al., 2013; Lee et al., 2009). Les protéines disulfides isomérases (PDI) ont aussi un rôle de chaperonne en plus de leur fonction isomérase. Enfin, une peroxydase impliquée dans l'élimination de l'H₂O₂ a été identifiée comme étant une protéine chaperonne chez le riz (Hong et al., 2018). Il s'agit d'OsAPX2 qui est capable de passer d'une activité peroxydase à une activité chaperonne par oligomérisation. Il semblerait donc que certaines protéines redox puissent également adopter un rôle de protéines chaperonnes lors d'un stress. Cette régulation est souvent associée à des modifications de leurs cystéines par sulfénylation ou suroxydation qui peuvent agir comme des senseurs de stress (Kumsta and Jakob, 2009; Conway and Lee, 2015). Pour GRXS17, la perte du cluster est suivie de la sulfénylation de ses cystéines catalytiques et de la formation de ponts disulfures (Chapitre 2). Il serait également pertinent de tester l'activité chaperonne sur les orthologues de GRXS17 de la levure et de mammifères et dans les autres GRX à cœur Fe-S des plantes, pour savoir si ce rôle est conservé. En effet, nous

avons observé que GRXS14 est capable de compléter la fonction de GRXS17 dans la thermotolérance et pourrait jouer un rôle de chaperonne.

III. GRXS17 dans des fonctions nucléaires :

En effet, la localisation nucléaire seule est suffisante pour conférer la thermotolérance à la plante ce qui suggère que cette fonction de GRXS17 est probablement accomplie dans le noyau. GRXS17 pourrait protéger des cibles nucléaires par son activité chaperonne lors d'un stress thermique long de type TMHT. Trouver des cibles nucléaires que GRXS17 protégerait lors du stress confirmerait cette dernière hypothèse. Pour le moment, certains interactants nucléaires ont été identifiés dans les IPs à 2h à 35°C comme MEE59, CNX1 et BOLA2. BOLA2 pourrait être protégée par GRXS17 lors du stress thermique. Une protéine nucléaire très peu caractérisée (AT1G62480) liant le calcium vacuolaire a également été identifiée dans les protéines interagantes de GRXS17. Cependant aucune étude n'a encore montré un rôle de cette protéine dans le stress thermique. Nous avons aussi identifié CPCK2 qui pourrait également être impliquée dans le stress thermique (Wang et al., 2014). Des essais d'IPs complémentaires pour la seconde stratégie vont être réalisés. L'ensemble des interactants qui ont été et qui seront identifiés dans les futures analyses pourront éclaircir le rôle nucléaire de GRXS17 dans la thermotolérance notamment la probable liaison avec son activité de protection (holdase).

Des interactants nucléaires de GRXS17 ont précédemment été identifiés. Une sous-unité des complexes NF-Y (NF-YC11) qui lient les CCAAT box de promoteurs est un interactant de GRXS17 (Laloum et al., 2013; Knesting et al., 2015). Néanmoins, ce facteur n'a pas été caractérisé plus précisément. Un autre candidat est BOLA2 dont l'orthologue Fra2 chez la levure fait partie du complexe Fra1/2-GRX3/4, interagissant avec le facteur de transcription Aft1 qui régule l'homéostasie du fer (Kumánovics et al., 2008). Dans mes résultats d'IP, je n'ai pas identifié de facteurs de transcription interagissant avec GRXS17. Cela peut être dû à la faible présence de ces facteurs dans les extraits de plantules utilisés. Mes résultats de RNAseq ont mis en évidence une dérégulation de l'expression de cluster de gènes dans le mutant *grxs17*. Ceci pourrait suggérer qu'un ou plusieurs facteurs nucléaires pourraient être régulés par GRXS17. Une analyse plus ciblée des éléments régulateurs des promoteurs des gènes dérégulés pourrait

mettre en évidence des éléments communs. J'envisage d'effectuer cette analyse par le logiciel MEME. D'autres candidats régulateurs pourraient être les kinases identifiées dans les IP.

Nous avons montré que la protéine GRXS17 se trouvait sous forme d'oligomères lors d'un stress. On peut se poser la question de la répartition des formes oligomériques dans le cytosol et le noyau ? On pourrait approcher cette question en étudiant les formes dimériques et oligomériques dans des fractions cytosoliques ou nucléaires purifiées. Ces questions ont déjà été décrites dans la littérature, par exemple pour NPR1, un master régulateur de l'expression des gènes de défense chez la plante (Tada et al., 2008). Cette protéine se trouve sous forme oligomérique dans le cytosol, formation qui est facilitée par la nitrosylation de la cystéine 156, et en réponse à l'attaque d'une bactérie pathogène, cette forme est réduite par la TRXh5 par coupure des ponts disulfures. La protéine est alors capable d'aller dans le noyau pour activer les gènes de défense. Nous pouvons donc supposer que, lorsque cela devient nécessaire, l'oligomère serait réduit par un réducteur physiologique afin de permettre son changement de compartiment. Pour valider cela, nous pourrions faire un gel natif sur nos extraits totaux et sur des fractions cytoplasmiques et nucléaires de protéines avec un prétraitement par un réducteur de ponts disulfures biologiques comme par exemple des GRX ou TRX cytosoliques (GRXC1, GRXC2, TRXh3) ou des TRX nucléaires comme NRX1. Ces études complémentaires pourraient également permettre de mettre en évidence le réducteur physiologique des oligomères de GRXS17 formés par l'activité holdase lors d'un stress (Figure 65). Pour finir, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour améliorer notre compréhension de ce rôle de GRXS17 dans la thermotolérance et confirmer le lien entre la thermotolérance et la fonction chaperonne.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel biologique :

I.1 Les souches bactériennes :

La souche bactérienne DH5 α d'*Escherichia Coli* a été utilisée pour les clonages moléculaires classiques. Toutes les protéines ont été produites par les souches bactériennes BL21 (DE3) ou la soluBL21 d'*Escherichia Coli* pour les protéines GRXS17 contenant des mutations de cystéines selon les recommandations du fabricant (amsbio). Enfin, la génération de plantes transgéniques a nécessité l'utilisation de la souche bactérienne GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens*. Elles ont respectivement été cultivées à 37°C, à 20°C (pour la soluBL21) et 28°C en milieu LB (Lysogeny Broth) solide (35g/L de LB agar) ou liquide (25g/L de LB). Pour la culture d'*Agrobacterium tumefaciens*, du milieu YEP composé de 10g Yeast Extract, 10g de bactopeptone et 4g de NaCl a été utilisé.

I.2 Le matériel végétal :

Les travaux présentés dans cette étude ont été réalisés sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Les écotypes sauvages Columbia (Col-0) et Landsberg erecta (Ler) et les mutants knock-out (KO) *grxs17* dans ces deux écotypes (respectivement SALK_021301 et CSHL GT22726) ont été utilisés dans cette étude. Le mutant *grxs15^{kd}* (knockdown) a également été utilisé dans notre étude (Ströher et al., 2016). Les différentes lignées complémentées étudiées ont été introgressées dans le mutant *grxs17* de l'écotype Col-0.

Tableau 6 : Liste des amorces pour les différents clonages.

Nom	Séquences	Rôle	Vecteur de destination
Clonages de GRXS17			
new-GRXS17-3'	GCAGCAGGCTCCGCAGAAGT	amorce forward pour génotyper les plantes transformées	
new-GRXS17-5'	GGCGCACCAGTCGTGCTTCA	amorce reverse pour génotyper les plantes transformées	
PromS17(2)-KPNI-53	CTTGGTACCTTAAGTAAATGATGTATATATTGTTGATGC	Amorce forward promoteur S17 -2500 avant ATG - KPNI	pCAMBIA-1302
PromS17(2)-NCOI-35	GACCATGGTCAAGAGGGAGAAGGATCTCTTAAAC	Amorce reverse promoteur S17 -1 ATG – NCOI	pCAMBIA-1302
s17-1-spei	CGACTAGTAGTGAGCTTTTCCAAACGGCTCTTG	amorce reverse 1er domaine S17 – SpeI	pCAMBIA-1302
s17-1-stop	CGACTAGTTTAAGTGAGCTTTTCCAAACGGCTCTTG	Amorce reverse - crée un STOP après le 1 ^{er} domaine de S17 – SpeI	pCAMBIA-1302
s17-3-NcoI	CCATGGGGAGGAGGGGTTAGTTCA	Amorce forward à partir du 3 ^{ème} domaine de S17 – NcoI	pCAMBIA-1302
s17-12-spei	CGACTAGTAAGATCTTTGAAAGCATCTTTTAG	Amorce reverse - fin du 2 ^{ème} domaine de S17 – SpeI	pCAMBIA-1302
s17-12-stop	CGACTAGTTTAAAGATCTTTGAAAGCATCTTTTAG	Amorce reverse - crée un STOP après le 2 ^{ème} domaine de S17 – SpeI	pCAMBIA-1302
s17-123-spei	CGACTAGTTTTCTCGGTCAAGACCTTTTTTC	Amorce reverse - fin du 3 ^{ème} domaine de S17 – SpeI	pCAMBIA-1302
s17-123-stop	CGACTAGTTTATTCTCGGTCAAGACCTTTTTTC	Amorce reverse - crée un STOP après le 3 ^{ème} domaine de S17 – SpeI	pCAMBIA-1302
S17-234-NdeI-F	GTCATATGGCCGATGCTCTCAAGAGCCGTTTG	amorce forward - à partir du 2 ^{ème} domaine de S17 – NdeI	pET16b
s17-1234-bamh1	GCGGATCCCTCGGATAGAGTTGCTTTGAG	amorce reverse – fin du 4 ^{ème} domaine de S17 – BamH1	pET16b
S17-1234-speI-R	CGACTAGTCTCGGATAGAGTTGCTTTGAG	amorce reverse – fin du 4 ^{ème} domaine de S17 – SpeI	pCAMBIA-1302
s17-1234-stop	CGACTAGTTTACTCGGATAGAGTTGCTTTGAG	amorce reverse - crée un STOP à la fin de S17 – SpeI	
s17-kpn1-nco1	GCGGTACCATGGTCCGTACGGTGAAGGATATCGTTTTC	amorce forward – début S17 – NCOI+KpnI	PCAMBIA1302 / pFL635
s17-nco1-234	CGCCATGGCCGATGCTCTCAAGAGCCGTTTG	amorce forward - à partir du 2 ^{ème} domaine de S17 – NCOI	pCAMBIA-1302
s17-ncoi	CGCCATGGTCCGTACGGTGAAGGATATCGTTTTC	amorce forward – début S17 – NCOI	pCAMBIA-1302
S17-NdeI-5'	GTCATATGAGCGGTACGGTGAAGGATATCG	amorce forward – début S17 – NdeI	pET16b
s17-nls-kpn1+nco1	GCGGTACCATGGTCCCTCCTAAGAAAAAGAGGAAAAGT CGGTACGGTGAAGGATATCG	amorce forward – ajoute un NLS devant S17 – NCOI+KpnI	PCAMBIA1302 / pFL635
Clonage de GRXS14			
s14-ncoi	CGCCATGGCTCTCCGATCTGTCAAAAC	amorce forward S14 avec peptide d'adressage – NCOI	pCAMBIA-1302
s14-ncoid64	CGCCATGGCTCTTACGCCGCAACTTAAAG	amorce forward S14 sans peptide d'adressage – NCOI	pCAMBIA-1302
S14-pep-Ncoi-35	CCATGGAGCATCGGAATTTAGTTGG	amorce forward S14 sans peptide d'adressage – NCOI	pCAMBIA-1302
s14-spei	CGACTAGTAGAGCACATAGCTTTCTCCACC	amorce reverse S14 – SpeI	pCAMBIA-1302
Clonage de cytMDH1			
mdh1-nde-F	GTCATATGGCGAAAGAACCAGTTC	amorce forward – Start – NdeI	pET16b
mdh1-bamH1-R	GGATCCTTAAGAGAGGCATGAGTAC	amorce reverse – Stop – BamH1	pET16b

II. Les Méthodes :

II.1 Les conditions classiques de cultures végétales :

II.1.1 La culture végétale sur milieu gélosé :

Les graines sont stérilisées pendant 15 minutes à l'éthanol 70% sous agitation et sont rincées à l'éthanol 95% avant d'être séchées sous la hotte. Ces graines sont semées sur du milieu $\frac{1}{2}$ MS (2,2 g/L de Murashige and Skoog, 0,5 g/L de MES et 1 % de plant agar (w/v), ajusté à un pH 5,8) et sont stratifiées 48h à 4°C dans le noir. Les plantules poussent sous une luminosité de $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en cycle jours longs (16h de jour et 8h de nuit) à 20°C. Ces conditions ont été systématiquement utilisées sauf indication contraire et sont nommées conditions classiques de culture. Les semis ont été placés dans une armoire de culture en LED ou bien dans une enceinte de culture Sanyo (MLR-351H) pour la croissance des plantes à différentes conditions de températures (28°C et 35°C). Pour chacune des expériences, les réplicats techniques sont des répétitions faites lors de la même expérience. Les réplicats appelés biologiques sont les répétitions faites lors d'expériences indépendantes sur un lot de graines différent.

II.1.2 La culture végétale en terreau :

Dans des conditions classiques de culture, les graines sont semées sans stérilisation et vernalisation préalable sur un mélange de quatre volumes de terreau pour 1 volume de vermiculite. La croissance se fait dans une chambre de culture à une température constante de 20°C en condition de jours longs (16h/8h), d'une intensité lumineuse de $100 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ avec un pourcentage d'humidité variant de 60 à 75%. Lors du cycle de reproduction, les hampes florales sont attachées à des tuteurs puis ensachées lorsque les premières siliques commencent à sécher. Les plantes sont ensuite placées en salle de séchage puis au bout de deux semaines, les graines sont récoltées à l'aide d'un tamis.

Tableau 7 : Liste des amorces ayant servi à créer les mutations sur GRXS14/GRXS17 par mutagenèse dirigée.

Nom	Séquences	Rôle	Vecteur de destination
s14cs35	GTTGGAGAATCCAGACATCGGGAAGTC	remplace le C en S dans le site actif de S14 – amorce reverse	pCAMBIA-1302 / pET16b
s14cs53	GACTTCCCGATGTCTGGATTCTCCAAC	remplace le C en S dans le site actif de S14 – amorce forward	pCAMBIA-1302 / pET16b
s14gp35	CAGTGTGGAGAATGGACACATCGGGAAGTC	remplace le G en P dans le site actif de S14 – amorce reverse	pCAMBIA-1302 / pET16b
s14gp53	GACTTCCCGATGTGTCCATTCTCCAACACTG	remplace le G en P dans le site actif de S14 – amorce forward	pCAMBIA-1302 / pET16b
S17-1cs-35	CTGCTTCGAAGCATCAGACCAAGAAGCCCAGAA	remplace le C en S dans le site actif du domaine 1 – amorce reverse	pCAMBIA-1302 / pET16b
S17-1cs-53	TTCTGGGCTTCTTGGTCTGATGCTTCGAAGCAG	remplace le C en S dans le site actif du domaine 1 – amorce forward	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-2cs35	CCTGCTAAACCCAGACCTAGGCTCTTC	remplace le C en S dans le site actif du domaine 2 – amorce reverse	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-2cs53	GAAGAGCCTAGGTCTGGGTTTAGCAGG	remplace le C en S dans le site actif du domaine 2 – amorce forward	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-2gp35	CTTTCCTGCTAAACGGACACCTAGGCTCTTC	remplace le G en P dans le site actif du domaine 2 – amorce reverse	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-2gp53	GAAGAGCCTAGGTGTCCGTTTAGCAGGAAAG	remplace le G en P dans le site actif du domaine 2 – amorce forward	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-3cs-35	CCCACTGAACCCAGACTTTGGTTCTTC	remplace le C en S dans le site actif du domaine 3 – amorce reverse	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-3cs-53	GAAGAACCAAAGTCTGGGTTTAGTGGG	remplace le C en S dans le site actif du domaine 3 – amorce forward	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-3gp-35	CACTTCCCACTGAACGGACACTTTGGTTCTTC	remplace le G en P dans le site actif du domaine 3 – amorce reverse	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-3gp-53	GAAGAACCAAAGTGTCCGTTTAGTGGGAAAGTG	remplace le G en P dans le site actif du domaine 3 – amorce forward	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-4cs-35	GGAGCTAAATCCGGATTTGCGTTCATC	remplace le C en S dans le site actif du domaine 4 – amorce reverse	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-4cs-53	GATGAACCGAAATCCGGATTTAGCTCC	remplace le C en S dans le site actif du domaine 4 – amorce forward	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-4gp-35	CAACTTTGGAGCTAAATGGGCATTTGCGTTCATC	remplace le G en P dans le site actif du domaine 4 – amorce reverse	pCAMBIA-1302 / pET16b
s17-4gp-53	GATGAACCGAAATGCCATTTAGCTCCAAAGTTG	remplace le G en P dans le site actif du domaine 4 – amorce forward	pCAMBIA-1302 / pET16b

II.2 La génération de lignées transgéniques stables :

II.2.1 Le clonage du gène, la mutagenèse et la construction des plasmides :

Les clonages ont été réalisés à l'aide des amorces présentées dans les Tableaux 6 et 7. Pour les constructions des lignées complémentées transgéniques dans *grxs17*, de l'ADNc de GRXS17 (At4g04950) a été inséré dans le plasmide Easy pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA). Différentes mutations ponctuelles de cystéines en sérines dans GRXS17 ont été générées à l'aide du kit de mutagenèse dirigée QuikChange II (Agilent) à l'aide d'amorces détaillées dans le Tableau 7. Pour générer des lignées complémentées, les gènes ont ensuite été clonés dans le vecteur pCAMBIA1302 (comme ceci : Pr35S:gène:GFP, GFP en C-terminal). Dans le but d'effectuer des immunoprécipitations, *GRXS17* a été cloné dans un vecteur pCAMBIA 1300 modifié portant une séquence Flag-Flag-HA-HA fusionnée à l'extrémité C-terminale de la protéine (comme ceci : Pr35S:gène:Flag/Flag/HA/HA). La lignée adressée exclusivement au noyau a été construite par l'ajout du peptide d'adressage nucléaire (NLS) du SV40, en N-terminal de la protéine de fusion GRXS17-GFP. Le NES a été positionné en aval de la protéine GRXS17 et provient de la séquence NES de RTL2 (Comella et al., 2008).

II.2.2 La transformation des plantes par *Agrobacterium tumefaciens* :

Les plasmides ont été transférés dans *Arabidopsis thaliana* dans *grxs17* (Col-0) via la souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens* en utilisant les méthodes décrites (Clough and Bent, 1998). Les transformants ont été sélectionnés en culture *in vitro* dans des boîtes contenant du milieu ½ MS avec 50 µg ml⁻¹ d'hygromycine et contrôlés par PCR en utilisant les amorces appropriées (Tableau 6). Les graines des transformants en F2 et les transformants des générations suivantes sont à nouveau sélectionnés sur antibiotique jusqu'à l'obtention de plantes homozygotes pour l'insertion.

II.3 L'étude de la croissance racinaire :

II.3.1 Conditions de croissance :

Les plantules vont pousser sous des conditions de culture classique (décrites plus haut) à différentes températures dans des boîtes carrées qui sont placées verticalement pour privilégier la croissance des racines. Pour chacune des expériences et par condition, il y a un minimum de deux réplicats techniques contenant environ 20 graines par boîtes.

II.3.2 La mesure de la longueur moyenne de la racine primaire :

Pour la mesure de la longueur moyenne de la racine primaire, des photos sont prises à la fin de chaque expérience. Ces photos sont converties en « 8-bit tiff » afin de permettre la mesure des racines à l'aide du logiciel ImageJ et l'extension NeuronJ. Une règle a été placée sur chaque photo afin de pouvoir convertir la valeur mesurée en centimètres.

II.3.3 La mesure de la vitesse d'élongation moyenne de la racine primaire :

La croissance de la racine primaire a été suivie tous les deux jours par un trait effectué au niveau de la pointe de la racine. Pour la mesure de la vitesse d'élongation de Col-0 et *grxs17* à 20°C et à 28°C, les mesures ont été prises à partir du 5^{ème} jour après la mise en place dans l'enceinte de culture Sanyo jusqu'au 15^{ème} jour. Pour Col-0 et *grxs17*, 14 et 21 plantules ont respectivement été suivies lors des 15 jours de croissance. Pour la mesure de la vitesse d'élongation lors de l'application d'un stress thermique de 3 jours à 35°C, les croissances des racines primaires des plantules de Col-0 (26 plantules au total), du mutant *grxs17* (27 plantules), du quadruple mutant *hsfalqk* (25 plantules) et des lignées 35S:GRXS17 (4) (17 plantules) et 35S:GRXS17-C33/179/309/416 (1) (33 plantules) ont été suivies pendant 20 jours. Les plantules ont poussé sur du milieu classique de culture selon un régime particulier : 7 jours à 20°C, 3 jours à 35°C et 10 jours à 20°C. Les racines primaires ont été mesurées au bout du 4^{ème} jour tous les deux jours afin de calculer la vitesse d'élongation de ces racines primaires au cours de l'application du régime.

II.3.4 L'étude du méristème apical racinaire :

Les mesures des zones méristématique et d'élongation ont été faites sur des racines de Col-0 et *grxs17* âgées de 10 jours ayant poussé verticalement *in vitro* dans des conditions classiques de culture. Les racines primaires ont été colorées à l'iodure de propidium (1µg/ml, 15 minutes) avant d'être observées au microscope confocal. Cet agent intercalant fluorescent, excité à 535 nm, émet son max de fluorescence à 617nm.

II.4 L'étude de la croissance aérienne :

Les graines des plantes Col-0, *grxs17*, 35S:GRXS17-GFP (4), 35S:NLS-GRXS17-GFP (2) et 35S:GRXS14-GFP (1) ont été semées sur du terreau contenant de la vermiculite et ont été stratifiées à 4°C durant 48h. Elles ont germé et poussé pendant deux semaines à 22°C en conditions de jours longs, avec une intensité lumineuse de 180 µmol.m⁻².s⁻¹ et 55% d'humidité le jour et 60% la nuit, avant que la moitié ne soit transférée à 28°C. Nous avons entrepris de faire pousser les plantes 2 semaines à 22°C avant de les transférer puisque lors d'un premier essai directement à 28°C, les plantules de *grxs17* ont été très affectées et leur croissance s'est arrêtée. Pour la culture des plantes, nous avons utilisé des enceintes de culture Percival (Percival scientifique).

Pour la première expérience avec Col-0, *grxs17*, 35S:GRXS17-GFP (4), 35S:NLS-GRXS17-GFP (2) et 35S:GRXS14-GFP (1), 16 plantes de chaque lignées ont été étudiées à 22°C et 16 plantes à 28°C (au total 32 plantes pour chaque). Des photos à ces deux températures ont été prises au bout de 3 semaines de croissance et les rosettes de la moitié des plantes (8 plantes par condition) ont été récoltées et pesées. Nous avons décidé d'effectuer ceci à 3 semaines puisque les plantes débutaient la floraison à 28°C (et certaines à 22°C), ce qui signifie que la croissance des rosettes est terminée. Au bout de 7 semaines, les premières plantes ont été ensachées jusqu'à la fin de la 8^{ème} semaine. Elles sont restées deux semaines supplémentaires dans les enceintes de culture Percival pour permettre la maturation des dernières siliques. Les plantes ont ensuite été séchées (arrêt de l'arrosage et mis en place dans une salle de séchage) et les graines ont été récoltées. Pour la seconde expérience, Col-0, *grxs17* et la lignée 35S:GRXS17-GFP (4) ont poussé dans les mêmes conditions. Pour chaque lignée, 12 plantes à 22°C et 12 plantes à 28°C

ont été étudiées sur 10 semaines. Cette fois-ci, les rosettes n'ont été ni récoltées ni pesées mais comme précédemment, des photos ont été prises et un suivi a été fait très régulièrement.

II.5 L'étude de la thermotolérance :

II.5.1 Présentation de la méthode :

Les plantules ont poussé sur du milieu MS (sans MES) contenant 0,1% de saccharose, avec une intensité lumineuse de $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en condition de jours longs (16h de jour et 8h de nuit) après une stratification de 48h à l'obscurité à 4°C. Ces essais ont d'abord été effectués dans l'équipe de Yee-Yung Charng en collaboration (Yeh et al., 2012) puis ont été adaptées et répétées au laboratoire. Les plantes ont été semées dans une boîte ronde qui a été divisée en triangles. Ces triangles contiennent chacun 21 graines. Des réplicats techniques ont été réalisés lors de la même expérience. Les essais ont été répétés plusieurs fois sur différents lots de graines frais (répétitions biologiques). Le pourcentage moyen de survivants est établi pour les plantules ayant retrouvé une croissance foliaire après ces stress sont alors considérées comme survivantes. Le nombre de survivants est divisé par le nombre total de plantules puis le résultat est multiplié par 100 pour obtenir le pourcentage moyen de survivants.

II.5.2 Utilisation des régimes SAT, LAT et BT :

Pour l'ensemble de ces 3 régimes, les plantules ont germé et poussé dans l'armoire de culture à 20°C et les différents stress thermiques ont été appliqués dans un bain marie. Pour cela, les boîtes ont été scellées avec du scotch d'électricien et elles ont été entourées de papier aluminium afin de les mettre à l'obscurité lors de ce traitement thermique. Les boîtes ont été déposées au fond du bain marie et la température a été minutieusement surveillée à l'aide d'un thermomètre. Ces deux derniers éléments permettent d'assurer un traitement thermique optimal. Pour le régime SAT (thermotolérance acquise à court terme), les plantules ont poussé 5 jours à 20°C avant de subir deux stress thermiques courts de 60min à 37°C et 150min à 44°C avec un intervalle de 2h à 20°C. Le pourcentage de survivants a été calculé 9 jours après l'application de ces stress thermiques. Pour la LAT (thermotolérance acquise à long terme), les plantules

poussent 3 jours à 20°C avant de subir deux stress thermiques de 60min à 37°C et de 50min à 44°C avec un intervalle de 2 jours à 20°C. Le pourcentage de survivants a été calculé 12 jours après l'application de ces stress thermiques. Pour la BT (thermotolérance basale), un traitement de 23min à 44°C au bout de 4 jours après le début de l'expérience a été effectué sur Col-0, *grxs17* et le mutant *hsp101*. Cependant, le test n'a pas fonctionné puisque les plantules du contrôle positif *hsp101* ont eu 12 jours après l'application du stress thermique un pourcentage de survivants proche de Col-0. De nouveaux essais avec un traitement plus long de 25, 28 et 30min ont été effectués mais ceci a donné le même résultat. Les pourcentages de survivants ont été calculés sur 2 réplicats biologiques (sauf pour BT) et avec à chaque fois deux réplicats techniques contenant chacun deux triangles par boîte.

II.5.3 Utilisation du régime TMHT :

Les plantes ont germé et poussé dans l'enceinte de culture Sanyo ce qui permet d'appliquer le stress thermique de 6 jours à 35°C. Le régime TMHT (thermotolérance à des températures modérément élevées) consiste à laisser les plantes pousser 7 jours à 20°C puis à appliquer un traitement thermique long de 6 jours à 35°C avant d'abaisser la température à nouveau à 20°C durant 8 jours (ou plus). Le pourcentage de survivants a été calculé au bout de ces 8 jours mais les plantes ont été laissées plus longtemps dans l'enceinte de culture afin de valider les pourcentages de survivants. Ce régime a été testé sur la plupart des lignées complémentées lors de 3 répétitions biologiques en prenant pour contrôle Col-0, *grxs17* et le quadruple mutant *hsfa1qk*. Chaque lignée a été testée sur 1 à 3 répétitions biologiques et avec au moins deux triangles par répétition dans la même boîte ou une boîte différente. Les lignées complémentées choisies comme lignées de référence ont été testées sur 2 et 3 répétitions biologiques.

II.6 L'observation des protéines taguées au microscope confocal :

Les lignées complémentées contenant le tag GFP ont été observées au microscope confocal avec l'aide de Claire Picart de la plateforme imagerie du laboratoire. Sauf indication contraire, l'observation s'est faite sur les racines primaires de plantules âgées de 10 jours ayant poussé sur milieu gélosé dans des conditions de culture classique. Pour chaque lignée complémentée, au moins 5 racines ont été observées et systématiquement comparées aux racines de deux

Tableau 8 : Liste des amorces ayant servi lors des PCR quantitatives.

Nom	AGI	Séquences
<i>ACTIN7</i>	AT5G09810	CCAGGAATTGCTGACCGTAT (F) / GATTGATCCTCCGATCCAGA (R)
<i>RHIP1</i>	AT4G26410	TGATGAAAAAGGAGAGCAGGA (F) / CATCAAATCAGCAGCTTCACA(R)
<i>GRXS17</i>	AT4G04950	TCCCTCGTGCTCACTTCTTT (F) / GCAGCAACAGAGTAAGCCTCA (R)
<i>HSP70-4</i>	AT3G12580	TCACTCGTGCTAGGTTTCG (F) / TGCTGCACTTTGGGAAT (R)
<i>HSP90-1</i>	AT5G52640	GGAACTAAGATCACCCCTCTTCCT (F) / CTCAGAGTGCTTCTTCACCAAG (R)
<i>APX2</i>	AT3G09640	GAGTAGTTGCTGTTGAGATCAC (F) / GTCTACCAGGATGAAATGGAAT (R)
<i>HTA9</i>	AT1G52740	ATGTCGGGGAAAGGTGCTAAAGG (F)/CTATTCCTTGGCGGATTTGTTG (R)
<i>VSP1</i>	AT5G24780	CCAAAGGACTTGCCCTAAAGAA (R) / AGAGAGGAGAGTGTCGTCTA (R)

contrôles : Col-0 et *grxs17* avec les mêmes paramètres. Les observations au microscope confocal ont été effectuées à l'aide du microscope Axio Observer Z1 avec le module confocal LSM 700 et le logiciel ZEN 2010 (Zeiss). Le laser 405nm et le filtre BP 420-480 ont été utilisés pour l'observation du DAPI, le laser 488nm et filtre BP 490-555 pour l'observation des lignées étiquetées GFP et enfin, le laser 555nm pour l'iodure de propidium.

II.7 Les analyses globales :

II.7.1 Analyse du transcriptome par RNAsequencing :

II.7.1.1 Plan de l'expérimentation :

Les plantules de Col-0 et de *grxs17* ont poussé 14 jours à 20°C dans des conditions classiques de culture (il s'agit des deux premières conditions). Elles ont ensuite été exposées à un stress thermique de 2h à 28°C et de 24h à 28°C (les quatre autres conditions).

II.7.1.2 Extraction de l'ARN :

L'extraction d'ARN est réalisée à partir de poudre de plantes, préalablement conservée dans de l'azote liquide, avec 1ml de Trizol/50-100mg de poudre de plantes. Après une incubation de 5 min à température ambiante, du Chloroforme est ajouté à raison de 0,2 ml par ml de Trizol. Les échantillons sont agités par retournement 15 secondes avant d'être placés 2 à 3 minutes à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 15 minutes à 12 000g à 4°C et le surnageant a été récupéré. L'ARN est précipité avec de l'isopropanol à raison de 0,5ml par ml de Trizol. Les échantillons sont ensuite incubés 10 min à température ambiante puis centrifugés 15 minutes à 12 000g à 4°C. Le surnageant a été éliminé par retournement et les culots d'ARN ont été lavés avec 1ml d'éthanol à 75% pour 1ml de Trizol. Les échantillons ont ensuite été vortexés très rapidement et à nouveau été centrifugés 5 min à 7 500g à 4°C. Le surnageant a été jeté et les culots ont été séchés 10 min à l'air dans la glace. Ces derniers ont ensuite été dissous dans 50µl d'eau distillée, stérile et RNase-free puis les concentrations d'ARN ont été mesurées par Nanodrop avant que les échantillons ne soient conservés à -20°C (ou -80°C pour du long terme).

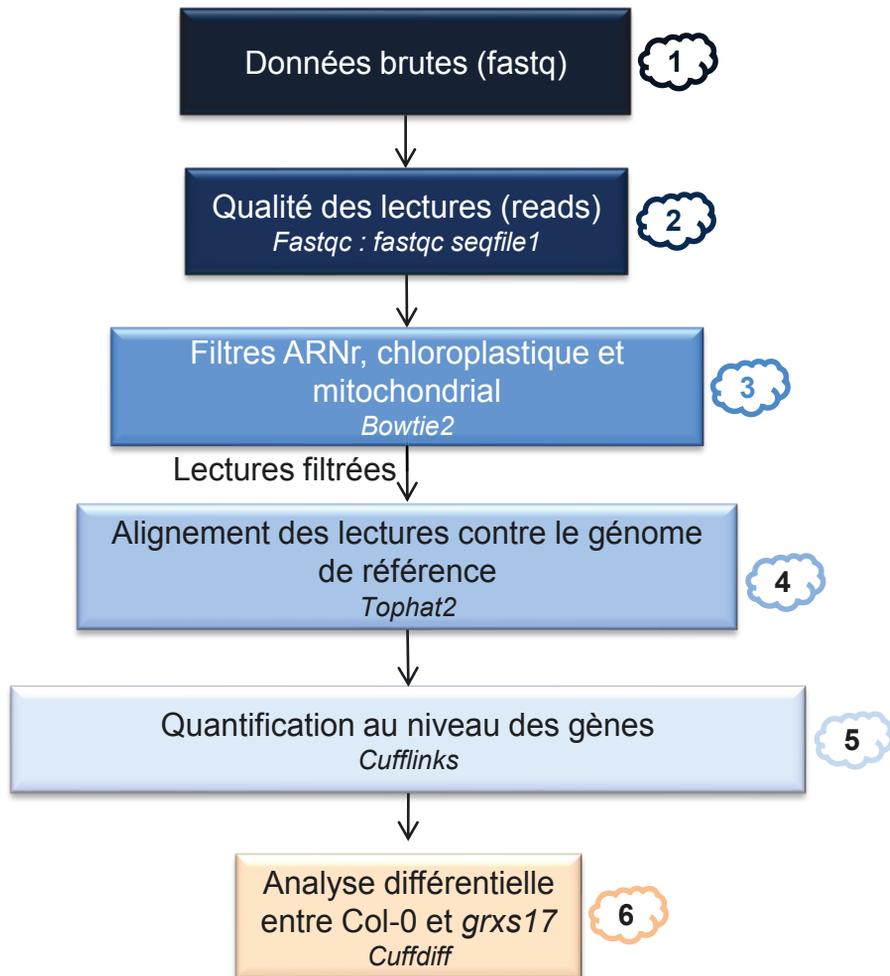


Figure 66 : Le « pipeline » d'analyse du RNA-seq.

De 1 à 6, les différentes étapes d'analyse des données brutes du RNAseq. Les séquences de références génomiques et le fichier d'annotation des gènes sont issus de TAIR10.

II.7.1.3 Validation par RT-qPCR :

II.7.1.3.1 Le traitement DNase :

Le traitement DNase a été fait sur 10µg d'ARN à partir du kit TURBO DNA-free™ (INVITROGEN) selon les recommandations du fabricant.

II.7.1.3.2 La transcription inverse en ADNc :

La transcription inverse des ARN en ADNc après un traitement DNase a été réalisée à partir du kit SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (INVITROGEN) selon les recommandations du fabricant.

II.7.1.3.3 La PCR quantitative :

Les PCR quantitatives ont été réalisées avec l'aide d'Edouard Jobet de la plateforme qPCR du laboratoire sur les ADNc à partir du kit Takyon™ NoRox SYBR® MasterMix blue dTTP (EUROGENTEC) selon les recommandations du fabricant avec les amorces spécifiques (Tableau 8). Les données des qPCR ont été analysées par la méthode d'analyse du ΔC_T . Les valeurs relatives des transcrits ont été normalisées sur l'expression des gènes de l'actine 7 (ACTIN7_AT5G09810) et de RHIP1 (AT4G26410).

II.7.1.4 Séquençage et traitement des données :

Les données brutes obtenues après le séquençage de l'ARN (RNAseq) ont été analysées par Marie-Christine Carpentier de la plateforme Bioinformatique du laboratoire selon le pipeline décrit dans la Figure 66. La longueur des lectures est de 76pb. Le séquençage a été effectué en « single-end » sur un HiSeq2500. Il y a eu 20 millions de lectures par réplicat (pour rappel il y a eu 3 réplicats par conditions). La bonne qualité des données brutes (très bonne qualité car supérieures à 30) a été vérifiée par Fastqc (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). On élimine les lectures correspondant aux ARNr et aux chloroplastes et mitochondries par alignement avec bowtie2

contre ces séquences (issues de TAIR10). Seulement 3% des lectures ont été éliminées par réplicats. Ces données filtrées ont été alignées contre les cinq chromosomes de TAIR 10 avec Tophat2 (Kim et al., 2013a) en utilisant les paramètres par défaut et un fichier d'annotation des gènes (un gtf) issu de TAIR10. La quantification des gènes et des éléments transposables a été effectuée pour chaque librairie par Cufflinks (Trapnell et al., 2010). Le comptage est exprimé en rpkm (=lecture par kb par million de lectures alignées) ce qui permet d'avoir une normalisation par la profondeur de la librairie et par la longueur des gènes. Un dernier filtre a été apposé, les gènes dont la déviation standard est plus importante que la moyenne ont été enlevés. Enfin, une analyse différentielle a été effectuée entre deux conditions (*grxs17* vs Col-0) avec Cuffdiff (qui appartient à la suite Cufflinks) en prenant en compte le nombre de réplicats pour chaque condition (estimation de la dispersion). Une valeur de FDR à 5% a été appliquée pour l'analyse statistique. Pour une meilleure résolution, les gènes qui sont peu exprimés (moins d'1 rpkm dans toutes les librairies) sont enlevés. Au total, 14381 gènes sont ressortis de cette analyse.

Les annotations fonctionnelles GO ont été réalisées à partir de FatiGO de Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>) et à partir du système de classification Panther d'AmiGO (<http://pantherdb.org/webservices/go/overrep.jsp>). Pour détecter les catégories surreprésentées significativement un test de Fisher a été appliqué ($p\text{-value} < 0,05$).

Les clusters of orthologous groups (COG) sont issus de la base de données <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/> et ont été représentés sous forme de barplot sous R, pour les gènes d'intérêts.

Les heatmap ont été générées en utilisant la fonction heatmap2 du package R gplots (<https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>). Pour le clustering hiérarchique, une distance de Pearson et une méthode de moyenne ont été utilisées.

II.7.2 Etude du métabolome :

Les échantillons récoltés sont immédiatement congelés dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse par GC-MS. 100 mg de tissus sont broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un cryobroyeur et remis en

suspension dans 1,4 ml de méthanol. 60 µl d'un standard interne (0,2 mg/ml de ribitol) sont ajoutés pour normaliser les analyses. L'extraction, la dérivation et l'injection des échantillons ont été effectuées comme décrit par Lisec et al., (2006). Les métabolites sont identifiés par comparaison avec des bases de données standards de métabolites (Kopka et al., 2005; Schauer et al., 2005; Fernie et al., 2011). Les résultats obtenus sont normalisés en fonction de la surface des pics des standards internes et mis en forme par le logiciel Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific).

II.8 La génération de protéines recombinantes :

II.8.1 Clonage du gène, mutagenèse et insertion dans le plasmide d'induction :

Pour les constructions des protéines recombinantes, l'ADNc de GRXS17 (At4g04950) a été inséré dans le plasmide Easy pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA). Les différentes mutations ponctuelles de cystéines en sérines dans GRXS17 ont été générées à l'aide du kit de mutagenèse dirigée QuikChange II (Agilent) à l'aide d'amorces détaillées dans le Tableau 7. GRXS17, GRXS17-C33S, GRXS17-C179/309/416S, GRXS17-C33/179/306/416S (contenant toutes une étiquette Histidine en N-terminal) et la malate déshydrogénase1 cytosolique (cytMDH1) d'*Arabidopsis thaliana* (At1g04410) ont été clonés dans le plasmide pET16b (Novagen ; Merck Biosciences) en utilisant les amorces détaillées dans le Tableau 6.

II.8.2 La production et la purification de protéines recombinantes :

Pour la production des protéines recombinantes, les protéines ont été produites dans les souches bactériennes BL21 (DE3) et soluBL21 d'*Escherichia coli*. A partir d'une colonie résistante à l'ampicilline (100 mg.mL⁻¹), les bactéries ont été cultivées à 37°C et induites 3h par 100 µM d'isopropyl-β-D-galactopyranoside (IPTG) en phase exponentielle (DO=0,5). Les bactéries ont été centrifugées 20 min à 4500 rpm. Les culots sont conservés à -80°C avant l'extraction des protéines. Ils ont été remis en suspension dans du tampon (Tris-HCl 50 mM pH 7,0, NaCl 100 mM et un comprimé anti-protéase (Roche) pour 25 ml). L'extraction protéique a été réalisée à l'aide d'un appareil de lyse cellulaire (Constant Systems Limited, Northants, Royaume-Uni).

Elles ont ensuite été purifiées par un kit conformément aux instructions du fabricant (kit His-bind, Millipore).

II.9 Etude des activités foldase et holdase :

L'activité foldase a été examinée à l'aide de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) provenant de *Leuconostoc mesenteroides* sous sa forme lyophilisée (Sigma-Aldrich) selon Lee et al., (2009). L'enzyme (12,9 μ M) est préalablement dénaturée dans une solution d'urée à 6,5M pH 7,5 pendant 2h30 à température ambiante. Elle est ensuite renaturée en présence du composé à tester : 3 μ L de la solution précédente est diluée dans 150 μ L de tampon phosphate (100mM) pH 7,5 auquel on ajoute X μ L du composé à tester et QSP 300 μ L avec de l'eau distillée. L'activité de la G6PDH est ensuite mesurée aux temps 0, 30, 60, 120 et 180min. Le mélange réactionnel est composé de 50 μ L de l'échantillon, 350 μ L de tampon Tris (100mM) pH 7,5, 20 μ L de NADP⁺ (50mM), 10 μ L de G6P (200mM) et 370 μ L d'eau. La production de NADPH est suivie à 340nm.

L'activité holdase a été mesurée en utilisant le MDH1 cytosolique (cytMDH1) d'*Arabidopsis thaliana* (Huang et al., 2018) ou la citrate synthase (CS) de cœur de porc (Sigma-Aldrich) à respectivement 55°C ou 43°C selon Lee et al., 2009. Le mélange réactionnel se compose de tampon Tris pH 7,5 (50mM) QSP 800 μ L, de 0,5 μ M de cytMDH1 ou de CS et du composé à tester. Le trouble est mesuré au spectrophotomètre à 340nm.

II.10 Méthodes liées aux protéines :

II.10.1 Extraction des protéines :

Les protéines ont été extraites à partir de poudre de plantes broyées finement et d'un tampon d'extraction.

II.10.1.1 Extraits totaux de protéines :

Le tampon utilisé est composé de Tris pH 7,5 (50mM), NaCl (100mM) et 0,1% de SDS et l'extraction est faite à partir de 100mg de poudre de plantes dans 500 μ L de tampon.

II.10.1.2 Extraits de protéines solubles pour les IP et la FPLC :

Le tampon utilisé est composé de Tris pH 7,5 (50mM), NaCl (150mM), 10% de glycérol, MgCl₂ (5mM), 0,1% de NP40, 1 tablette anti-protéases Roche/10mL et MG132 (10μM) et l'extraction est faite à partir de 1g de poudre de plantes dans 5mL de tampon. Pour faciliter l'extraction, une rotation douce à 4°C a été faite pendant 2h. Les échantillons sont centrifugés 2 fois pendant 10min à 20 000g à 4°C pour sédimenter les débris.

II.10.2 Analyse par western blot :

Deux types de gels de polyacrylamide ont été utilisés lors des analyses, des gels SDS-PAGE préparés au laboratoire et des gels natifs préfabriqués par Biorad.

II.10.2.1 L'utilisation des gels dénaturants SDS-Page :

Les gels dénaturants SDS-PAGE (composés de deux couches), ont été préparés en deux épaisseurs différentes de 0,75mm ou 1,5mm en fonction des expériences (Acrylamide Euromedex 30% ratio 29/1). La concentration de la couche de séparation varie de 10 à 15% en fonction de la protéine étudiée et la couche de concentration est de 4%. Le tampon de charge utilisé est composé de 62,5mM de Tris pH 6,8, de 10% de glycérol, 2% de SDS et de 0,1% de bleu de Bromophénol, 5% de βmercaptoéthanol (pour les conditions réductrices), QSP eau distillée. Les protéines déposées dans le gel sont séparées sous un courant de 20mA par gel (ampérage constant). La cuve contient du tampon de migration composé de 25mM de Tris-HCl, de 250mM de Glycine et de 0,1% de SDS. Un marqueur de poids moléculaire coloré PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus de Thermo Scientific™ est également déposé sur les gels pour estimer le poids moléculaires des protéines.

Pour l'analyse par immunoblot, les protéines contenues dans les gels ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose BioRad 0,45μm ou des membranes de polyfluorure de vinylidène (Immobilon PVDF 0,45 μm, Merck Millipore™). Ces dernières doivent être activées avant le transfert par une incubation de 15s dans l'éthanol 95%. Préalablement au transfert, les gels sont

rincés sous agitation avec du tampon de transfert pendant 10min à température ambiante. Le tampon de transfert est composé de 25mM de Tris-HCl, de 192mM de Glycine et de 20% d'éthanol. Pour le transfert sur la membrane, nous utilisons un montage en milieu liquide. Le transfert s'effectue à 4°C pendant 1h30 (ou 3h pour les gels de 1,5mm) à 160mA (ampérage constant).

Une fois le transfert terminé, les membranes sont lavées sous agitation pendant 10 min à température ambiante dans une solution de TBST. Elles sont saturées avec du lait pendant 1h30 sous agitation. Le tampon TBST est composé de 50mM de Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl et 1% de Tween 20. Des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre GRXS17 (1: 25 000), BolA2 (1 : 5000), HSP70 (1 : 100 000) ont été utilisés. Des anticorps anti-lapin ou chèvre conjugués à la peroxydase de raifort (1:10 000) ont été utilisés comme anticorps secondaires. Deux anticorps monoclonaux commerciaux contre la GFP et le Flag HA tous deux greffés à la HRP ont également été utilisés. La révélation a été réalisée avec des réactifs de chimiluminescence améliorés (Immobilon Western chimiluminescent HRP Sbstate, Millipore).

II.10.2.2 L'utilisation des gels natifs :

Des gels natifs préfabriqués à gradient 4-16% ont également été utilisés conformément aux instructions du fabricant Biorad. Les protéines sont extraites dans le un tampon natif : 50mM de Tris-HCl pH 7, 150mM de NaCl, 10% de glycérol et une tablette anti-protéase/10ml de tampon. Le tampon de charge utilisé est composé de 62,5mM de Tris pH 6,8, de 25% de glycérol et de 0,1% de bleu de Bromophénol, 5% de β mercaptoéthanol (pour les conditions réductrices), QSP eau milliQ. Le marqueur de poids moléculaire qui a été utilisé est un marqueur natif incolore de la marque Novex. Un marqueur coloré classique est également utilisé en parallèle pour identifier la taille des protéines. Le tampon de migration est composé de 25mM de Tris-HCl et de 192mM de Glycine pH 8,3 et la migration a lieu à 4°C à faible ampérage (10mA). Le tampon de transfert est composé de 25mM de Tris, 192mM de glycine, 20% d'éthanol et 0,05% de SDS et le transfert est effectué 16h à 4°C à 40V. Le TBST est composé de 20mM de Tris-HCl pH 7,6, 137mM de NaCl et de 0.1% de Tween 20.

II.11 Chromatographie d'exclusion par la taille :

Toutes les expériences ont été réalisées à partir d'un système de chromatographie en phase liquide sur protéine ÄKTA (FPLC) (Amersham Biosciences, Suède) à 10°C. L'absorbance a été contrôlée à 280 nm. La colonne a été étalonnée avec du bleu de dextran (> 2 000 kDa), de la thyroglobuline (669 kDa), de la ferritine (440 kDa), de l'aldolase (158 kDa), de la conalbumine (75 kDa) et de l'ovalbumine (44 kDa). Ces expériences ont été réalisées avec l'aide d'Anne Debures et Julio Saez-Vaquez du laboratoire.

II.11.1 Avec la colonne superose 6 :

Pour les protéines recombinantes GRXS17 (forme sauvage et formes mutées), une colonne Superose 6 a été utilisée, équilibrée avec un tampon contenant 150 mM de NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) et 5 mM de MgCl₂ à un débit de 0,5 ml.min⁻¹. Tous les échantillons contenant les protéines recombinantes ont été dialysés avant l'injection. Pour les conditions réductrices, les échantillons ont été réduits avec 100 mM de DTT avant l'injection. Ils ont été dialysés et analysés avec le tampon contenant 5mM de DTT afin de maintenir les protéines à l'état réduit. Des fractions de 2ml ont été collectées.

II.11.2 Avec la colonne sephacryl S300 HR :

Pour les extraits totaux de protéines de plantes, une colonne HiPrep Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare Life Sciences) a été utilisée. Elle a été équilibrée avec un tampon contenant 150mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl (pH 7,5) et 5mM MgCl₂, 10% de glycérol et 0,1% de NP40 à un débit de 0,5 ml.min⁻¹. Les échantillons ont été extraits dans le même tampon dans lequel ont été ajoutés 10 µM de MG132 et un cocktail anti-protéases (Roche) à une concentration de 1 comprimé/10mL. L'extraction est réalisée à partir d'1g de poudre de plantes dans 2 volumes de tampon. Pour chaque condition, deux répétitions ont été effectuées. Ces deux répétitions ont été mélangées et des westerns blot ont été réalisés à partir des différentes fractions obtenues.

II.12 Recherche de cible et/ou de partenaires par immunoprécipitation :

II.12.1 Plan de l'expérimentation :

Des plantes de 14 jours ont poussé selon des conditions classiques de culture à 20°C et ont été traitées thermiquement 24h à 28°C ou 2h à 35°C. Elles ont été récoltées et congelées directement dans l'azote liquide avant d'être placées à -80°C. Les protéines ont été extraites selon la méthode d'extraction décrite plus haut. Les immunoprécipitations ont été menées directement sur ces extraits de protéines d'une part. D'autre part, sur un mélange des fractions obtenues après FLPC allant des fractions 18-21 et 22-25 pour la condition 20°C et 16-19 et 22-26 pour la condition 2h à 35°C (voir Figure 2C de l'article). Des protéines provenant de plantes 35S:GRXS17-Flag/HA ou 35S:GRXS17 (en contrôle) ont été utilisées pour des expériences d'immunoprécipitation.

II.12.2 Immunoprécipitation :

Des billes d'agarose M2 avec un anticorps anti-flag lié de manière covalente ont été préparées selon les instructions du fabricant Sigma. Les protéines ont été extraites par la méthode d'extraction décrites précédemment à partir d'1g de poudre (II.10.1.2). A la fin de l'extraction, 20µL d'input est récupéré (contrôle). L'extrait a été incubé avec les billes (200µL de billes/g de matériel) pendant 1 à 2h à 4°C en rotation douce. L'échantillon a ensuite été centrifugé 1min à 1000g à 4°C et le culot contenant les billes a été récupéré (un aliquot de surnageant est conservé en contrôle). Quatre lavages avec 1mL de tampon d'extraction sont effectués avec à chaque fois une incubation de 15min à 4°C sous rotation et une centrifugation de 1min à 1000g à 4°C (un aliquot du surnageant est récupéré à la fin des lavages en contrôle). Enfin, les protéines ont été éluées dans une solution de glycine 0,1 M pH 2,5 (400µL pour 200µL de billes). Le surnageant a été récupéré après une agitation de 5min et une centrifugation de 1min à 1000g à 4°C et a été conservé à -20°C pour la spectrométrie de masse (décrite dans l'article).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T.S., and Genschik, P.** (2009). Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **19**: 1188–1193.
- Achard, P., Vriezen, W.H., Straeten, D. Van Der, and Harberd, N.P.** (2003). Ethylene Regulates Arabidopsis Development via the Modulation of DELLA Protein Growth Repressor Function. *Plant Cell Online* **15**: 2816–2825.
- Allen, R. and Tresini, M.** (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 463–499.
- Apel, K. and Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373–399.
- Arnaud, N., Ravet, K., Borlotti, A., Touraine, B., Boucherez, J., Fizames, C., Briat, J.-F., Cellier, F., and Gaymard, F.** (2007). The iron-responsive element (IRE)/iron-regulatory protein 1 (IRP1)–cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants. *Biochem. J.* **405**: 523–531.
- Asada, K.** (1999). THE WATER-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., Kiso, K., and Yoshikawa, K.** (1974). Univalent Reduction of Molecular-Oxygen By Spinach-Chloroplasts on Illumination. *J. Biol. Chem.* **249**: 2175–2181.
- Avval, F.Z. and Holmgren, A.** (2009). Molecular mechanisms of thioredoxin and glutaredoxin as hydrogen donors for mammalian S phase ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **284**: 8233–8240.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U.** (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science (80-.)*. **353**: aac4354-1–12.
- Baldwin, K.L., Strohm, A.K., and Masson, P.H.** (2013). Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots. *Am. J. Bot.* **100**: 126–142.
- Balk, J. and Lobréaux, S.** (2005). Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci.* **10**: 324–331.
- Balk, J. and Pilon, M.** (2011). Ancient and essential: The assembly of iron-sulfur clusters in

- plants. *Trends Plant Sci.* **16**: 218–226.
- Balk, J. and Schaedler, T.A.** (2014). Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**: 125–153.
- Banci, L., Camponeschi, F., Ciofi-Baffoni, S., and Muzzioli, R.** (2015). Elucidating the Molecular Function of Human BOLA2 in GRX3-Dependent Anamorsin Maturation Pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **137**: 16133–16143.
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K., and Rouhier, N.** (2008). Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J.* **27**: 1122–1133.
- Baniwal, S.K. et al.** (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.* **29**: 471–87.
- Banzet, N., Richaud, C., Deveaux, Y., Kazmaier, M., Gagnon, J., and Triantaphylidès, C.** (1998). Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant J.* **13**: 519–527.
- Barros, M.D., Czarnecka, E., and Gurley, W.B.** (1992). Mutational analysis of a plant heat shock element. *Plant Mol. Biol.* **19**: 665–75.
- Bassham, J.A., Benson, A.A., and Calvin, M.** (1950). THE PATH OF CARBON IN PHOTOSYNTHESIS: VIII. THE RÔLE OF MALIC ACID. *J. Biol. Chem.* **185**: 781–787.
- Bastow, E.L., Bych, K., Crack, J.C., Le Brun, N.E., and Balk, J.** (2017). NBP35 interacts with DRE2 in the maturation of cytosolic iron-sulphur proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **89**: 590–600.
- Bäurle, I.** (2016). Plant Heat Adaptation: priming in response to heat stress. *F1000Research* **5**: 694.
- Baxter, A., Mittler, R., and Suzuki, N.** (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* **65**: 1229–1240.
- Beemster, G.T.S. and Baskin, T.I.** (1998). Analysis of Cell Division and Elongation Underlying the Developmental Acceleration of Root Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **116**: 1515–1526.
- Begas, P., Liedgens, L., Moseler, A., Meyer, A.J., and Deponte, M.** (2017). Glutaredoxin catalysis requires two distinct glutathione interaction sites. *Nat. Commun.* **8**: 1–13.

- Bencze, K.Z., Kondapalli, K.C., Cook, J.D., McMahon, S., Millán-Pacheco, C., Pastor, N., and Stemmler, T.L.** (2006). The structure and function of frataxin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**: 269–291.
- Bender, K.W., Wang, X., Cheng, G.B., Kim, H.S., Zielinski, R.E., and Huber, S.C.** (2015). Glutaredoxin AtGRXC2 catalyses inhibitory glutathionylation of *Arabidopsis* BRI1-associated receptor-like kinase 1 (BAK1) *in vitro*. *Biochem. J.* **467**: 399–413.
- Benhar, M., Forrester, M.T., and Stamler, J.S.** (2009). Protein denitrosylation: Enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 721–732.
- Bentley, N.J., Fitch, I.T., and Tuite, M.F.** (1992). The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast* **8**: 95–106.
- Bernard, D.G., Cheng, Y., Zhao, Y., and Balk, J.** (2009). An Allelic Mutant Series of ATM3 Reveals Its Key Role in the Biogenesis of Cytosolic Iron-Sulfur Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **151**: 590–602.
- Bernard, D.G., Netz, D.J., Lagny, T.J., Pierik, a J., and Balk, J.** (2013). Requirements of the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway in *Arabidopsis*. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci* **368**: 20120259.
- Bethke, P.C. and Jones, R.L.** (2001). Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *Plant J.* **25**: 19–29.
- Blanc, G., Baraka, t A., Guyot, R., Cooke, R., and Delseny, M.** (2000). Extensive Duplication and Reshuffling in the *Arabidopsis* Genome. *Plant Cell Online* **12**: 1093–1102.
- Boston, R.S., Viitanen, P. V., and Vierling, E.** (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* **32**: 191–222.
- Boyer, J.S.** (1982). Plant Productivity and Environment. *Science* (80-.). **218**: 443–448.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., and Meyerowitz, E.M.** (2000). Dependence of Stem Cell Fate in. *Science* (80-.). **289**: 617–619.
- Brandes, H.K., Larimer, F.W., Geck, M.K., Stringer, C.D., Schurmann, P., and Hartman, F.C.** (1993). Direct identification of the primary nucleophile of thioredoxin f. *J. Biol. Chem.* **268**: 18411–18414.
- Brynildsen, M.P. and Liao, J.C.** (2009). An integrated network approach identifies the isobutanol response network of *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* **5**: 1–13.

- Bukau, B. and Horwich, A.L.** (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351–366.
- Busch, W., Wunderlich, M., and Schöffl, F.** (2005). Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **41**: 1–14.
- 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.
- La Camera, S., L'Haridon, F., Astier, J., Zander, M., Abou-Mansour, E., Page, G., Thurow, C., Wendehenne, D., Gatz, C., Métraux, J.P., and Lamotte, O.** (2011). The glutaredoxin ATGRXS13 is required to facilitate *Botrytis cinerea* infection of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* **68**: 507–519.
- Caño-Delgado, A., Lee, J.-Y., and Demura, T.** (2010). Regulatory Mechanisms for Specification and Patterning of Plant Vascular Tissues. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**: 605–637.
- Capaldi, A.P., Kleanthous, C., and Radford, S.E.** (2002). Im7 folding mechanism: Misfolding on a path to the native state. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 209–216.
- Capaldi, A.P., Shastry, M.C.R., Kleanthous, C., Roder, H., and Radford, S.E.** (2001). Ultrarapid mixing experiments reveal that Im7 folds via an on-pathway intermediate. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 68–72.
- Capitani, G., Marković-Housley, Z., DelVal, G., Morris, M., Jansonius, J.N., and Schürmann, P.** (2000). Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *J. Mol. Biol.* **302**: 135–154.
- Cha, H. et al.** (2008). PICOT is a critical regulator of cardiac hypertrophy and cardiomyocyte contractility. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **45**: 796–803.
- Cha, M.K. and Kim, I.H.** (2009). Preferential overexpression of glutaredoxin3 in human colon and lung carcinoma. *Cancer Epidemiol.* **33**: 281–287.
- Chae, H.B. et al.** (2013). Thioredoxin reductase type C (NTRC) orchestrates enhanced thermotolerance to *Arabidopsis* by its redox-dependent holdase chaperone function. *Mol. Plant* **6**: 323–336.
- Charng, Y. -y., Liu, H. -c., Liu, N. -y., Chi, W. -t., Wang, C. -n., Chang, S. -h., and Wang, T. -t.** (2006). A Heat-Inducible Transcription Factor, HsfA2, Is Required for Extension

- of Acquired Thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **143**: 251–262.
- Cheng, N.H.** (2008). AtGRX4, an Arabidopsis chloroplastic monothiol glutaredoxin, is able to suppress yeast grx5 mutant phenotypes and respond to oxidative stress. *FEBS Lett.* **582**: 848–854.
- Cheng, N.H., Liu, J.Z., Brock, A., Nelson, R.S., and Hirschi, K.D.** (2006). AtGRXcp, an Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin, is critical for protection against protein oxidative damage. *J. Biol. Chem.* **281**: 26280–26288.
- Cheng, N.H., Liu, J.Z., Liu, X., Wu, Q., Thompson, S.M., Lin, J., Chang, J., Whitham, S.A., Park, S., Cohen, J.D., and Hirschi, K.D.** (2011a). Arabidopsis monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, is critical for temperature-dependent postembryonic growth and development via modulating auxin response. *J. Biol. Chem.* **286**: 20398–20406.
- Cheng, N.H., Zhang, W., Chen, W.Q., Jin, J., Cui, X., Butte, N.F., Chan, L., and Hirschi, K.D.** (2011b). A mammalian monothiol glutaredoxin, Grx3, is critical for cell cycle progression during embryogenesis. *FEBS J.* **278**: 2525–2539.
- 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.
- Chibani, K., Wingsle, G., Jacquot, J.P., Gelhaye, E., and Rouhier, N.** (2009). Comparative genomic study of the thioredoxin family in photosynthetic organisms with emphasis on populus trichocarpa. *Mol. Plant* **2**: 308–322.
- Chiti, F. and Dobson, C.M.** (2017). Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* **86**: 27–68.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E., and Fischer, R.L.** (2002). DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell* **110**: 33–42.
- Chow, L. -P, Iwadate, H., Yano, K., Kamo, M., Tsugita, A., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A. -L, and Schürmann, P.** (1995). Amino Acid Sequence of Spinach Ferredoxin:Thioredoxin Reductase Catalytic Subunit and Identification of Thiol Groups Constituting a Redox-Active Disulfide and a [4Fe-4S] Cluster. *Eur. J. Biochem.* **231**: 149–156.

- Chuang, S.E. and Blattner, F.R.** (1993). Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 5242–52.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Colleen, M.E., Peter, R., and Lars, T.** (1964). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides: V. PURIFICATION AND PROPERTIES OF THIOREDOXIN REDUCTASE FROM *ESCHERICHIA COLI* B. *J. Biol. Chem.* **239**: 3436–3444.
- Comella, P., Pontvianne, F., Lahmy, S., Vignols, F., Barbezier, N., DeBures, A., Jobet, E., Brugidou, E., Echeverria, M., and Sáez-Vásquez, J.** (2008). Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3'ETS in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* **36**: 1163–1175.
- Considine, M.J. and Foyer, C.H.** (2014). Redox Regulation of Plant Development. *Antioxid. Redox Signal.* **21**: 1305–1326.
- Conway, M.E. and Lee, C.** (2015). The redox switch that regulates molecular chaperones. *Biomol. Concepts* **6**: 269–284.
- Cordoba, E., Aceves-Zamudio, D.L., Hernández-Bernal, A.F., Ramos-Vega, M., and León, P.** (2015). Sugar regulation of SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1 (STP1) expression in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **66**: 147–159.
- Couturier, J. 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.
- Couturier, J., Jacquot, J.P., and Rouhier, N.** (2009). Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 2539–2557.
- Couturier, J., Wu, H.-C., Dhalleine, T., Pégeot, H., Sudre, D., Gualberto, J.M., Jacquot, J.-P., Gaymard, F., Vignols, F., and Rouhier, N.** (2014). Monothiol Glutaredoxin–BoLA Interactions: Redox Control of *Arabidopsis thaliana* BoLA2 and SufE1. *Mol. Plant* **7**: 187–205.
- Crafts-Brandner, S.J. and Salvucci, M.E.** (2002). Sensitivity of Photosynthesis Heat Stress in a C4 Plant, Maize, to Heat Stress. *Plant Physiol.* **129**: 1773–1780.
- Craig, E.A. and Marszalek, J.** (2002). A specialized mitochondrial molecular chaperone system: A role in formation of Fe/S centers. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 1658–1665.
- Creissen, G.** (1999). Elevated Glutathione Biosynthetic Capacity in the Chloroplasts of

- Transgenic Tobacco Plants Paradoxically Causes Increased Oxidative Stress. *Plant Cell Online* **11**: 1277–1292.
- Cui, H., Kong, D., Wei, P., Hao, Y., Torii, K.U., Lee, J.S., and Li, J.** (2014). SPINDLY, ERECTA, and its ligand STOMAGEN have a role in redox-mediated cortex proliferation in the arabidopsis root. *Mol. Plant* **7**: 1727–1739.
- Dafny-Yelin, M., Tzfira, T., Vainstein, A., and Adam, Z.** (2008). Non-redundant functions of sHSP-CIs in acquired thermotolerance and their role in early seed development in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **67**: 363–373.
- Dahl, J.U., Koldewey, P., Salmon, L., Horowitz, S., Bardwell, J.C.A., and Jakob, U.** (2015). HdeB functions as an acid-protective chaperone in bacteria. *J. Biol. Chem.* **290**: 65–75.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Breusegem, F.** (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 779–795.
- Dat, J.F., Foyer, C.H., and Scott, I.M.** (1998). Changes in Salicylic Acid and Antioxidants during Induced Thermotolerance in Mustard Seedlings.: 1455–1461.
- Deant, C.** (1998). Control of flowering time Yaron Y Levy* and Caroline Deant. *Curr. Opin. Plant Biol.*: 49–54.
- Delewski, W., Paterkiewicz, B., Manicki, M., Schilke, B., Tomiczek, B., Ciesielski, S.J., Nierzwicki, L., Czub, J., Dutkiewicz, R., Craig, E.A., and Marszalek, J.** (2016). Iron-sulfur cluster biogenesis chaperones: Evidence for emergence of mutational robustness of a highly specific protein-protein interaction. *Mol. Biol. Evol.* **33**: 643–656.
- Delorme-Hinoux, V., Bangash, S.A.K., Meyer, A.J., and Reichheld, J.P.** (2016). Nuclear thiol redox systems in plants. *Plant Sci.* **243**: 84–95.
- Desikan, R., A.-H.-Mackerness, S., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (2001). Regulation of the Arabidopsis Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiol.* **127**: 159–172.
- Dietz, K.-J.** (2003). PLANT PEROXIREDOXINS Karl-Josef. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 93–107.
- Dixon, D.P. and Edwards, R.** (2010). Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *J. Biol. Chem.* **285**: 36322–36329.
- Driedonks, N., Xu, J., Peters, J.L., Park, S., and Rieu, I.** (2015). Multi-Level Interactions

Between Heat Shock Factors, Heat Shock Proteins, and the Redox System Regulate Acclimation to Heat. *Front. Plant Sci.* **6**: 999.

- Dutkiewicz, R. and Nowak, M.** (2018). Molecular chaperones involved in mitochondrial iron–sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Inorg. Chem.* **23**: 1–11.
- Eastmond, P.J.** (2007). MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE4 Is Required for Seed Storage Oil Hydrolysis and Postgerminative Growth in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **19**: 1376–1387.
- Eastmond, P.J.** (2006). SUGAR-DEPENDENT1 Encodes a Patatin Domain Triacylglycerol Lipase That Initiates Storage Oil Breakdown in Germinating Arabidopsis Seeds. *Plant Cell Online* **18**: 665–675.
- Edman, J.C., Ellis, L., Blacher, R.W., Roth, R.A., and Rutter, W.J.** (1985). Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* **317**: 267–270.
- Ellis, R.J. and Hartl, F.U.** (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**: 102–110.
- Evrard, A., Kumar, M., Lecourieux, D., Lucks, J., von Koskull-Döring, P., and Hirt, H.** (2013). Regulation of the heat stress response in *Arabidopsis* by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ* **1**: e59.
- Feng, Y., Zhong, N., Rouhier, N., Hase, T., Kusunoki, M., Jacquot, J.P., Jin, C., and Xia, B.** (2006). Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site. *Biochemistry* **45**: 7998–8008.
- Ferguson, N., Capaldi, A.P., James, R., Kleanthous, C., and Radford, S.E.** (1999). Rapid folding with and without populated intermediates in the homologous four-helix proteins Im7 and Im9. *J. Mol. Biol.* **286**: 1597–1608.
- Fernie, A.R., Aharoni, A., Willmitzer, L., Stitt, M., Tohge, T., Kopka, J., Carroll, A.J., Saito, K., Fraser, P.D., and DeLuca, V.** (2011). Recommendations for Reporting Metabolite Data. *Plant Cell* **23**: 2477–2482.
- Finet, C. and Jaillais, Y.** (2012). AUXOLOGY: When auxin meets plant evo-devo. *Dev. Biol.* **369**: 19–31.
- da Fonseca-Pereira, P., Daloso, D.M., Gago, J., Silva, F.M. de O., Condori-Apfata, J.A., Florez-Sarasa, I., Tohge, T., Reichheld, J.-P., Nunes-Nesi, A.A.R.F., and Araújo, W.L.** (2018). The Mitochondrial Thioredoxin System Contributes to the Metabolic

- Responses Under Drought Episodes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **10**: e22.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Angel, M., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., Davies, J.M., and Dolan, L.** (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442–446.
- Foyer, C., Rowell, J., and Walker, D.** (1983). Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* **157**: 239–244.
- Foyer, C.H. and Noctor, G.** (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866–1875.
- Foyer, C.H. and Noctor, G.** (2009). Redox Regulation in Photosynthetic Organisms. *Regulation* **11**: 861–905.
- Foyer, C.H. and Noctor, G.** (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* **119**: 355–364.
- Freedman, R.B., HIRST, T.R., and TUIITE, M.F.** (1994). Protein Disulfide-Isomerase - Building Bridges in Protein- Folding. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 331–336.
- Friel, C.T., Alastair Smith, D., Vendruscolo, M., Gsponer, J., and Radford, S.E.** (2009). The mechanism of folding of Im7 reveals competition between functional and kinetic evolutionary constraints. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 318–324.
- Friel, C.T., Capaldi, A.P., and Radford, S.E.** (2003). Structural analysis of the rate-limiting transition states in the folding of Im7 and Im9: Similarities and differences in the folding of homologous proteins. *J. Mol. Biol.* **326**: 293–305.
- Gaillochet, C., Daum, G., and Lohmann, J.U.** (2015). O Cell, Where Art Thou? The mechanisms of shoot meristem patterning. *Curr. Opin. Plant Biol.* **23**: 91–97.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., and Palme, K.** (1998). Regulation of Polar Auxin Transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* Vascular Tissue. *Science* (80-.). **282**: 2226–2230.
- Gamboa, a, Paéz-Valencia, J., Acevedo, G.F., Vázquez-Moreno, L., and Alvarez-Buylla, R.E.** (2001). Floral transcription factor AGAMOUS interacts in vitro with a leucine-rich repeat and an acid phosphatase protein complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**: 1018–1026.
- Gechev, T.S., Minkov, I.N., and Hille, J.** (2005). Hydrogen peroxide-induced cell death in

- arabidopsis: Transcriptional and mutant analysis reveals a role of an oxoglutarate-dependent dioxygenase gene in the cell death process. *IUBMB Life* **57**: 181–188.
- Geigenberger, P., Thormählen, I., Daloso, D.M., and Fernie, A.R.** (2017). The Unprecedented Versatility of the Plant Thioredoxin System. *Trends Plant Sci.* **22**: 249–262.
- Giacomelli, L., Rudella, A., and Wijk, K.J. Van** (2006). High Light Response of the Thylakoid Proteome in Arabidopsis Wild Type and the Ascorbate-Deficient Mutant *vtc2-2*. A Comparative Proteomics Study. *Society* **141**: 685–701.
- Giesguth, M., Sahm, A., Simon, S., and Dietz, K.J.** (2015). Redox-dependent translocation of the heat shock transcription factor AtHSFA8 from the cytosol to the nucleus in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett.* **589**: 718–725.
- Gill, S.S. and Tuteja, N.** (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal. Behav.* **5**: 26–33.
- Goemans, C. V., Vertommen, D., Agrebi, R., and Collet, J.F.** (2018). CnoX Is a Chaperedoxin: A Holdase that Protects Its Substrates from Irreversible Oxidation. *Mol. Cell* **70**: 614–627.e7.
- Graf, P.C.F., Martinez-Yamout, M., VanHaerents, S., Lilie, H., Dyson, H.J., and Jakob, U.** (2004). Activation of the Redox-regulated Chaperone Hsp33 by Domain Unfolding. *J. Biol. Chem.* **279**: 20529–20538.
- Graumann, J., Lilie, H., Tang, X., Tucker, K.A., Hoffmann, J.H., Vijayalakshmi, J., Saper, M., Bardwell, J.C.A., and Jakob, U.** (2001). Activation of the redox-regulated molecular chaperone Hsp33 - A two-step mechanism. *Structure* **9**: 377–387.
- Greetham, D., Vickerstaff, J., Shenton, D., Perrone, G.G., Dawes, I.W., and Grant, C.M.** (2010). Thioredoxins function as deglutathionylase enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochem.* **11**.
- Gulyás, Z., Simon-Sarkadi, L., Badics, E., Novák, A., Mednyánszky, Z., Szalai, G., Galiba, G., and Kocsy, G.** (2017). Redox regulation of free amino acid levels in Arabidopsis thaliana. *Physiol. Plant.* **159**: 264–276.
- Guo, M., Liu, J.-H., Ma, X., Luo, D.-X., Gong, Z.-H., and Lu, M.-H.** (2016). The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Guo, Y., Huang, C., Xie, Y., Song, F., and Zhou, X.** (2010). A tomato glutaredoxin gene

- SLGRX1 regulates plant responses to oxidative, drought and salt stresses. *Planta* **232**: 1499–1509.
- Gutsche, N., Thurow, C., Zachgo, S., and Gatz, C.** (2015). Plant-specific CC-type glutaredoxins: Functions in developmental processes and stress responses. *Biol. Chem.* **396**: 495–509.
- Hägglund, P., Bunkenborg, J., Maeda, K., Svensson, B., Per Hägglund, Jakob Bunkenborg, Kenji Maeda, and B.S., and Enzyme** (2008). Identification of Thioredoxin Disulfide Targets Using a Quantitative Proteomics Approach Based on Isotope-Coded Affinity Tags Per Ha research articles. *J. Proteome Res.* **7**: 5270–5276.
- Hall, A., Karplus, P.A., and Poole, L.B.** (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins - Structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* **276**: 2469–2477.
- Halliwell, B.** (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* **141**: 312–322.
- Hanzén, S. et al.** (2016). Lifespan Control by Redox-Dependent Recruitment of Chaperones to Misfolded Proteins. *Cell* **166**: 140–151.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M.** (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**: 324–332.
- Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M.** (2002). Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science* (80-.). **295**: 1852–1858.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M.M., Roychowdhury, R., and Fujita, M.** (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 9643–9684.
- Haslbeck, M.** (2002). sHsps and their role in the chaperone network. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 1649–1657.
- Haslbeck, M., Braun, N., Stromer, T., Richter, B., Model, N., Weinkauff, S., and Buchner, J.** (2004). Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **23**: 638–649.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H.E., Chen, S., Saibil, H.R., and Buchner, J.** (1999). Hsp26 : a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* **18**: 6744–6751.
- Haunhorst, P., Berndt, C., Eitner, S., Godoy, J.R., and Lillig, C.H.** (2010). Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein.

- Biochem. Biophys. Res. Commun. **394**: 372–376.
- Haunhorst, P., Hanschmann, E.-M., Bräutigam, L., Stehling, O., Hoffmann, B., Mühlenhoff, U., Lill, R., Berndt, C., and Lillig, C.H.** (2013). Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation. *Mol. Biol. Cell* **24**: 1895–903.
- He, Z., Li, L., and Luan, S.** (2004). Immunophilins and Parvulins. Superfamily of Peptidyl Prolyl Isomerases in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **134**: 1248–1267.
- Hendriks, J.H.M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., and Geigenberger, P.** (2003). ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in Response to Light and to Sugars in Leaves of Arabidopsis and Other Plant Species. *Rev. Cienc. Agron.* **133**: 838–849.
- Herrero, E. and De La Torre-Ruiz, M.A.** (2007). Monothiol glutaredoxins: A common domain for multiple functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 1518–1530.
- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., and Ikeuchi, M.** (2001). DNA Microarray Analysis of Cyanobacterial Gene Expression during Acclimation to High Light. *Plant Cell Online* **13**: 793–806.
- Hirata, A., Klein, B.J., and Murakami, K.S.** (2008). The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature* **451**: 851–854.
- Hobe, M., Müller, R., Grünewald, M., Brand, U., and Simon, R.** (2003). Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in Arabidopsis. *Dev. Genes Evol.* **213**: 371–381.
- Hoffmann, A., Bukau, B., and Kramer, G.** (2010). Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1803**: 650–661.
- Hoffmann, J.H., Linke, K., Graf, P.C.F., Lilie, H., and Jakob, U.** (2004). Identification of a redox-regulated chaperone network. *EMBO J.* **23**: 160–168.
- Hofmann, B., Hecht, H., and Flohé, L.** (2002). Peroxiredoxins. *Biol. Chem* **383**: 347–364.
- Hong, S.H., Tripathi, B.N., Chung, M.S., Cho, C., Lee, S., Kim, J.H., Bai, H.W., Bae, H.J., Cho, J.Y., Chung, B.Y., and Lee, S.S.** (2018). Functional switching of ascorbate peroxidase 2 of rice (OsAPX2) between peroxidase and molecular chaperone. *Sci. Rep.* **8**: 1–9.
- Hou, J., Zhang, Q., Zhou, Y., Ahammed, G.J., Zhou, Y., Yu, J., Fang, H., and Xia, X.** (2018). Glutaredoxin GRXS16 mediates brassinosteroid-induced apoplastic H₂O₂

- production to promote pesticide metabolism in tomato. *Environ. Pollut.* **240**: 227–234.
- Hou, X., Hu, W.-W., Shen, L., Lee, L.Y.C., Tao, Z., Han, J.-H., and Yu, H.** (2008). Global Identification of DELLA Target Genes during Arabidopsis Flower Development. *Plant Physiol.* **147**: 1126–1142.
- Houston, N.L., Fan, C., Xiang, J.Q.-Y., Schulze, J.-M., Jung, R., Boston, R.S., Carolina, N., and H, N.C.N.L.** (2005). Phylogenetic Analyses Identify 10 Classes of the Protein Disulfide Isomerase Family in Plants , Including Single-Domain Protein Disulfide Isomerase-Related Proteins 1 [w]. *Plant Physiol.* **137**: 762–778.
- Hu, Y. et al.** (2017). Silencing of OsGRXS17 in rice improves drought stress tolerance by modulating ROS accumulation and stomatal closure. *Sci. Rep.* **7**: 1–14.
- Hu, Y., Wu, Q., Sprague, S.A., Park, J., Oh, M., Rajashekar, C.B., Koiwa, H., Nakata, P.A., Cheng, N., Hirschi, K.D., White, F.F., and Park, S.** (2015). Tomato expressing Arabidopsis glutaredoxin gene AtGRXS17 confers tolerance to chilling stress via modulating cold responsive components. *Hortic. Res.* **2**: 15051.
- Huang, J., Willems, P., Van Breusegem, F., and Messens, J.** (2018). Pathways crossing mammalian and plant sulfenomic landscapes. *Free Radic. Biol. Med.*: 1–9.
- Huang, Z., Shi, T., Zheng, B., Yumul, R.E., Liu, X., You, C., Gao, Z., Xiao, L., and Chen, X.** (2017). APETALA2 antagonizes the transcriptional activity of AGAMOUS in regulating floral stem cells in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* **215**: 1197–1209.
- Ikeda, M., Mitsuda, N., and Ohme-Takagi, M.** (2011). Arabidopsis HsfB1 and HsfB2b Act as Repressors of the Expression of Heat-Inducible Hsfs But Positively Regulate the Acquired Thermotolerance. *Plant Physiol.* **157**: 1243–1254.
- Iñigo, S. et al.** (2016). Glutaredoxin GRXS17 Associates with the Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly Pathway. *Plant Physiol.* **172**: pp.00261.2016.
- Dello Ioio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., and Sabatini, S.** (2007). Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Curr. Biol.* **17**: 678–682.
- 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.
- Ireland, C.R., Baker, N.R., and Long, S.P.** (1985). The role of carbon dioxide and oxygen in determining chlorophyll fluorescence quenching during leaf development. *Planta* **165**:

477–485.

- Isakov, N., Witte, S., and Altman, A.** (2000). PICOT-HD: A highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 537–539.
- Jacob, P., Hirt, H., and Bendahmane, A.** (2017). The heat-shock protein / chaperone network and multiple stress resistance.: 405–414.
- Jacquot, J.-P., Rivera-Madrid, R., Marinho, P., Kollarova, M., Le Maréchal, P., Miginiac-Maslow, M., and Meyer, Y.** (1994). Arabidopsis thaliana NAPHP Thioredoxin Reductase: cDNA Characterization and Expression of the Recombinant Protein in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **235**: 1357–1363.
- Jaenicke, R. and Creighton, T.E.** (1993). Junior chaperones. *Curr. Biol.* **3**: 234–235.
- Jakob, U. and Buchner, J.** (1994). Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 205–211.
- Jakob, U., Eser, M., and Bardwell, J.C.A.** (2000). Redox switch of Hsp33 has a novel zinc-binding motif. *J. Biol. Chem.* **275**: 38302–38310.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J.** (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1517–20.
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M., and Bardwell, J.C.A.** (1999). Chaperone Activity with a Redox Switch. *Cell Press* **96**: 341–352.
- Jaspers, P. and Kangasjärvi, J.** (2010). Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol. Plant.* **138**: 405–413.
- Jeong, S., Trotochaud, A.E., and Clark, S.E.** (1999). The Arabidopsis CLAVATA2 Gene Encodes a Receptor-like Protein Required for the Stability of the CLAVATA1 Receptor-like Kinase. *Plant Cell Online* **11**: 1925–1934.
- Johansson, C., Kavanagh, K.L., Gileadi, O., and Oppermann, U.** (2007). Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria. *J. Biol. Chem.* **282**: 3077–3082.
- Joo, J.H., Bae, Y.S., and Lee, J.S.** (2001). Role of Auxin-Induced Reactive Oxygen Species in Root Gravitropism. *Plant Physiol.* **126**: 1055–1060.
- Kang, H.J., Heo, D.H., Choi, S.W., Kim, K.N., Shim, J., Kim, C.W., Sung, H.C., and Yun, C.W.** (2007). Functional characterization of Hsp33 protein from *Bacillus psychrosaccharolyticus*; additional function of HSP33 on resistance to solvent stress.

- Biochem. Biophys. Res. Commun. **358**: 743–750.
- Kataya, A.R.A. and Reumann, S.** (2010). Arabidopsis glutathione reductase 1 is dually targeted to peroxisomes and the cytosol. *Plant Signal. Behav.* **5**: 171–175.
- Keryer, E., Collin, V., Lavergne, D., Lemaire, S., and Issakidis-Bourguet, E.** (2004). Characterization of Arabidopsis mutants for the variable subunit of ferredoxin:thioredoxin reductase. *Photosynth. Res.* **79**: 265–274.
- Kim, D., Perte, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L.** (2013a). TopHat2 : accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions , deletions and gene fusions.: 1–13.
- Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Ulrich Hartl, F.** (2013b). Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., and Lill, R.** (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18**: 3981–3989.
- Klepikova, A. V., Kasianov, A.S., Gerasimov, E.S., Logacheva, M.D., and Penin, A.A.** (2016). A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J.* **88**: 1058–1070.
- Kneeshaw, S., Gelineau, S., Tada, Y., Loake, G.J., and Spoel, S.H.** (2014). Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Mol. Cell* **56**: 153–162.
- Kneeshawa, S., Keyania, R., Delorme-Hinoux, V., Imriea, L., Loakea, G.J., Bihana, T. Le, Reichheld, J.-P., and Spoel, S.H.** (2017). Nucleoredoxin guards against oxidative stress by protecting antioxidant enzymes. *PNAS* **114**: 8414–8419.
- Knowling, S.E., Figueiredo, A.M., Whittaker, S.B.M., Moore, G.R., and Radford, S.E.** (2009). Amino Acid Insertion Reveals a Necessary Three-Helical Intermediate in the Folding Pathway of the Colicin E7 Immunity Protein Im7. *J. Mol. Biol.* **392**: 1074–1086.
- Knuesting, J. et al.** (2015). Arabidopsis Glutaredoxin S17 and Its Partner, the Nuclear Factor Y Subunit C11/Negative Cofactor 2 α , Contribute to Maintenance of the Shoot Apical Meristem under Long-Day Photoperiod. *Plant Physiol.* **167**: 1643–1658.
- Kocsy, G., Tari, I., Vanková, R., Zechmann, B., Gulyás, Z., Poór, P., and Galiba, G.** (2013). Redox control of plant growth and development. *Plant Sci.* **211**: 77–91.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schluepmann, H., Paul, M., Ulrich, S., and Geigenberger, P.** (2005). Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox

- activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 11118–11123.
- Kopka, J. et al.** (2005). GMD@CSB.DB: The Golm metabolome database. *Bioinformatics* **21**: 1635–1638.
- von Koskull-Döring, P., Scharf, K.D., and Nover, L.** (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci.* **12**: 452–457.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G., and Sheen, J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 2940–2945.
- Krämer, U.** (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *Elife* **4**: 1–13.
- Kumánovics, A., Chen, O.S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E.M., Lin, H., Dingra, N.N., Outten, C.E., Keller, G., Winge, D., Ward, D.M., and Kaplan, J.** (2008). Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J. Biol. Chem.* **283**: 10276–10286.
- Kumar, S.V. and Wigge, P.A.** (2010). H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in *Arabidopsis*. *Cell* **140**: 136–147.
- Kumsta, C. and Jakob, U.** (2009). Redox-regulated chaperones. *Biochemistry* **48**: 4666–4676.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., and Kyojuka, J.** (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**: 652–655.
- Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J.-M., Bonnard, G., and Meyer, Y.** (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 14144–14149.
- Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., and Niebel, A.** (2013). CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends Plant Sci.* **18**: 157–166.
- Laporte, D., Olate, E., Salinas, P., Salazar, M., Jordana, X., and Holuigue, L.** (2012). Glutaredoxin GRXS13 plays a key role in protection against photooxidative stress in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **63**: 503–515.
- Larkindale, J. and Knight, M.R.** (2002). Protection against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in *Arabidopsis* Involves Calcium, Abscisic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid.

- Plant Physiol. **128**: 682–695.
- Larkindale, J. and Vierling, E.** (2008). Core Genome Responses Involved in Acclimation to High Temperature. Plant Physiol. **146**: 748–761.
- Laurent, C.T., Colleen, M.E., and Peter, R.** (1964). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides * IV. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THIOREDOXIN, THE HYDROGEN DONOR FROM ESCHERICHIA COLI B. J. Biol. Chem. **239**: 3436–3444.
- Lawlor, D.W.** (2002). Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomata vs. Metabolism and the role of ATP. Ann. Bot. **89**: 871–885.
- Layer, G., Aparna Gaddam, S., Ayala-Castro, C.N., Choudens, S.O. De, Lascoux, D., Fontecave, M., and Outten, F.W.** (2007). SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly. J. Biol. Chem. **282**: 13342–13350.
- Lee, B.H., Won, S.H., Lee, H.S., Miyao, M., Chung, W. II, Kim, I.J., and Jo, J.** (2000). Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. Gene **245**: 283–290.
- Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R., and Vierling, E.** (1997). A small heat shock protein stably binds heat denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. Embo J. **16**: 659–671.
- Lee, G.J. and Vierling, E.** (2000). A Small Heat Shock Protein Cooperates with Heat Shock Protein 70 Systems to Reactivate a Heat-Denatured Protein. Plant Physiol. **122**: 189–198.
- Lee, J.H., Hübel, A., and Schöffl, F.** (1995). Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic Arabidopsis. Plant J. **8**: 603–612.
- Lee, J.R. et al.** (2009). Heat-shock dependent oligomeric status alters the function of a plant-specific thioredoxin-like protein, AtTDX. Proc. Natl. Acad. Sci. **106**: 5978–5983.
- Lee, K.P., Kim, C., Landgraf, F., and Apel, K.** (2007). EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. **104**: 10270–10275.
- Li, H., Mapolelo, D.T., Randeniya, S., Johnson, M.K., and Outten, C.E.** (2012). Human glutaredoxin 3 forms [2Fe-2S]-bridged complexes with human BolA2. Biochemistry **51**: 1687–1696.
- Li, H. and Outten, C.E.** (2012). Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA-like proteins:

- [2Fe-2S] binding partners in iron homeostasis. *Biochemistry* **51**: 4377–4389.
- Li, S., Lauri, A., Ziemann, M., Busch, A., Bhave, M., and Zachgo, S.** (2009). Nuclear Activity of ROXY1, a Glutaredoxin Interacting with TGA Factors, Is Required for Petal Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Online* **21**: 429–441.
- Lill, R.** (2009). Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature* **460**: 831–838.
- Lill, R. et al.** (2015). The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **94**: 280–291.
- Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C., and Kispal, G.** (1999). The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol. Chem.* **380**: 1157–1166.
- Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsässer, H.P., Hausmann, A., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Stehling, O., Urzica, E., and Mühlenhoff, U.** (2006). Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**: 652–667.
- Lillig, C.H., Berndt, C., and Holmgren, A.** (2008). Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1780**: 1304–1317.
- Lillig, C.H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lonn, M.E., Hudemann, C., Bill, E., and Holmgren, A.** (2005). Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: A possible role as redox sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 8168–8173.
- Lin, C. and Chen, S.** (2018). New functions of an old kinase MPK4 in guard cells. *Plant Signal. Behav.* **13**: 1–4.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., and Fernie, A.R.** (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat. Protoc.* **1**: 387–396.
- Liu, H. and Charng, Y.** (2013). Common and distinct functions of *Arabidopsis* class A1 and A2 heat shock factors in diverse abiotic stress responses and development. *Plant Physiol.* **163**: 276–90.
- Liu, H.C., Liao, H.T., and Charng, Y.Y.** (2011). The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environ.* **34**: 738–751.
- Liu, X., Liu, S., Feng, Y., Liu, J.-Z., Chen, Y., Pham, K., Deng, H., Hirschi, K.D., Wang, X., and Cheng, N.** (2013a). Structural insights into the N-terminal GIY–YIG

- endonuclease activity of *Arabidopsis* glutaredoxin AtGRXS16 in chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. **110**: 9565–9570.
- Liu, Y., Zhang, C., Chen, J., Guo, L., Li, X., Li, W., Yu, Z., Deng, J., Zhang, P., Zhang, K., and Zhang, L.** (2013b). Arabidopsis heat shock factor HsfA1a directly senses heat stress, pH changes, and hydrogen peroxide via the engagement of redox state. Plant Physiol. Biochem. **64**: 92–98.
- Lohmann, C., Eggers-Schumacher, G., Wunderlich, M., and Schöfl, F.** (2004). Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in Arabidopsis. Mol. Genet. Genomics **271**: 11–21.
- Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., and Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. Cell **105**: 793–803.
- Luo, D., Bernard, D.G., Balk, J., Hai, H., and Cui, X.** (2012). The DUF59 Family Gene *AE7* Acts in the Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly Pathway to Maintain Nuclear Genome Integrity in *Arabidopsis*. Plant Cell **24**: 4135–4148.
- Marchal, C., Delorme-Hinoux, V., Bariat, L., Siala, W., Belin, C., Saez-Vasquez, J., Riondet, C., and Reichheld, J.-P.** (2014). NTR/NRX Define a New Thioredoxin System in the Nucleus of Arabidopsis thaliana Cells. Mol. Plant **7**: 30–44.
- Martins, L., Trujillo-hernandez, J.A., and Reichheld, J.** (2018). Thiol Based Redox Signaling in Plant Nucleus. Front. Plant Sci. **9**: 1–9.
- Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., and Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. Cell **95**: 805–815.
- McClung, C.R. and Davis, S.J.** (2010). Ambient thermometers in plants: From physiological outputs towards mechanisms of thermal sensing. Curr. Biol. **20**: R1086–R1092.
- Meister, A.** (1988). Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. J. Biol. Chem. **263**: 17205–17208.
- Meyer, A.J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., and 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.
- Meyer, Y., Belin, C., Delorme-Hinoux, V., Reichheld, J.-P., and Riondet, C.** (2012). Thioredoxin and Glutaredoxin Systems in Plants: Molecular Mechanisms, Crosstalks,

- and Functional Significance. *Antioxid. Redox Signal.* **17**: 1124–1160.
- Meyer, Y., Buchanan, B.B., Vignols, F., and Reichheld, J.-P.** (2009). Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. *Annu. Rev. Genet.* **43**: 335–367.
- Meyer, Y., Riondet, C., Constans, L., Abdelgawwad, M.R., Reichheld, J.P., and Vignols, F.** (2006). Evolution of redoxin genes in the green lineage. *Photosynth. Res.* **89**: 179–192.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., and Noctor, G.** (2010). Catalase function in plants: A focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* **61**: 4197–4220.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Keryer, E., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E., and Lemaire, S.D.** (2006). Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: New crosstalks to explore. *Photosynth. Res.* **89**: 225–245.
- Miller, G. and Mittler, R.** (2006). Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann. Bot.* **98**: 279–288.
- Miller, G., Shulaev, V., and Mittler, R.** (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plant.* **133**: 481–489.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**: 405–410.
- Mittler, R., Finka, A., and Goloubinoff, P.** (2012). How do plants feel the heat? *Trends Biochem. Sci.* **37**: 118–125.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., and Van Breusegem, F.** (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* **16**: 1360–1385.
- Moeder, W., Del Pozo, O., Navarre, D.A., Martin, G.B., and Klessig, D.F.** (2007). Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. *Plant Mol. Biol.* **63**: 273–287.
- Mogk, A., Bukau, B., and Kampinga, H.H.** (2018). Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. *Mol. Cell* **69**: 214–226.
- Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E., and Bukau, B.** (2003a). Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol. Microbiol.* **50**: 585–595.
- Mogk, A., Schlieker, C., Friedrich, K.L., Schönfeld, H.J., Vierling, E., and Bukau, B.**

- (2003b). Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J. Biol. Chem.* **278**: 31033–31042.
- Molina-Navarro, M.M., Casas, C., Piedrafita, L., Bellí, G., and Herrero, E.** (2006). Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria. *FEBS Lett.* **580**: 2273–2280.
- Montrichard, F., Alkhalfioui, F., Yano, H., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., and Buchanan, B.B.** (2009). Thioredoxin targets in plants: The first 30 years. *J. Proteomics* **72**: 452–474.
- Moon, J.C., Hah, Y.S., Kim, W.Y., Jung, B.G., Jang, H.H., Lee, J.R., Kim, S.Y., Lee, Y.M., Jeon, M.G., Kim, C.W., Cho, M.J., and Lee, S.Y.** (2005). Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **280**: 28775–28784.
- Moseler, A., Aller, I., Wagner, S., Nietzel, T., Przybyla-Toscano, J., Mühlenhoff, U., Lill, R., Berndt, C., Rouhier, N., Schwarzländer, M., and Meyer, A.J.** (2015). The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron-sulfur protein maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**: 13735–13740.
- Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R.** (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* **22**: 4815–4825.
- Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J.R., Uzarska, M.A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., Lillig, C.H., and Lill, R.** (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab.* **12**: 373–385.
- Muller-Moule, P., Havaux, M., and Niyogi, K.K.** (2003). Zeaxanthin Deficiency Enhances the High Light Sensitivity of an Ascorbate-Deficient Mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**: 748–760.
- Muller, R., Bleckmann, A., and Simon, R.** (2008). The Receptor Kinase CORYNE of *Arabidopsis* Transmits the Stem Cell-Limiting Signal CLAVATA3 Independently of CLAVATA1. *Plant Cell Online* **20**: 934–946.
- Mullineaux, P.M. and Rausch, T.** (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox

- regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynth. Res.* **86**: 459–474.
- Murmu, J., Bush, M.J., DeLong, C., Li, S., Xu, M., Khan, M., Malcolmson, C., Fobert, P.R., Zachgo, S., and Hepworth, S.R.** (2010). Arabidopsis Basic Leucine-Zipper Transcription Factors TGA9 and TGA10 Interact with Floral Glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and Are Redundantly Required for Anther Development. *Plant Physiol.* **154**: 1492–1504.
- Nagels Durand, A., Iñigo, S., Ritter, A., Iniesto, E., De Clercq, R., Staes, A., Van Leene, J., Rubio, V., Gevaert, K., De Jaeger, G., Pauwels, L., and Goossens, A.** (2016). The Arabidopsis Iron–Sulfur Protein GRXS17 is a Target of the Ubiquitin E3 Ligases RGLG3 and RGLG4. *Plant Cell Physiol.* **57**: 1801–1813.
- Navrot, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., and Rouhier, N.** (2006). Identification of a new family of plant proteins loosely related to glutaredoxins with four CxxC motives. *Photosynth. Res.* **89**: 71–79.
- Ndamukong, I., Abdallat, A. Al, Thurow, C., Fode, B., Zander, M., Weigel, R., and Gatz, C.** (2007). SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant J.* **50**: 128–139.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Yoshida, E., Maruta, T., Yoshimura, K., and Shigeoka, S.** (2006). Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J.* **48**: 535–547.
- Niu, Y. and Xiang, Y.** (2018). An Overview of Biomembrane Functions in Plant Responses to High-Temperature Stress. *Front. Plant Sci.* **9**: 1–18.
- Noctor, G. and Foyer, C.H.** (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 249–279.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., and Foyer, C.H.** (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* **53**: 1283–1304.
- Noctor, G., De Paepe, R., and Foyer, C.H.** (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* **12**: 125–134.
- Noctor, G., Reichheld, J.P., and Foyer, C.H.** (2017). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A., and Scharf, K.-D.** (2001). *Arabidopsis and the heat stress transcription factor world:*

- how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* **6**: 177.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., and Matsubayashi, Y.** (2008). Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* (80-.). **319**: 294.
- Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M., and Matsubayashi, Y.** (2009). A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 578–580.
- Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J.C., Lill, R., and Winge, D.R.** (2006). Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**: 17661–17669.
- Park, S.K. et al.** (2009a). Heat-shock and redox-dependent functional switching of an h-type Arabidopsis thioredoxin from a disulfide reductase to a molecular chaperone. *Plant Physiol.* **150**: 552–561.
- Park, S.K. et al.** (2009b). Heat-Shock and Redox-Dependent Functional Switching of an h-Type Arabidopsis Thioredoxin from a Disulfide Reductase to a Molecular Chaperone. *Plant Physiol.* **150**: 552–561.
- Payne, T., Johnson, S.D., and Koltunow, A.M.** (2004). KNUCKLES (KNU) encodes a C2H2 zinc-finger protein that regulates development of basal pattern elements of the *Arabidopsis* gynoecium. *Development* **131**: 3737–3749.
- Pei, Z.-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., KluÈsener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I.** (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731–734.
- Pérez-Pérez, M.E., Mauriès, A., Maes, A., Tourasse, N.J., Hamon, M., Lemaire, S.D., and Marchand, C.H.** (2017). The Deep Thioredoxome in *Chlamydomonas reinhardtii*: New Insights into Redox Regulation. *Mol. Plant* **10**: 1107–1125.
- Perez-Salamo, I. et al.** (2014). The Heat Shock Factor A4A Confers Salt Tolerance and Is Regulated by Oxidative Stress and the Mitogen-Activated Protein Kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiol.* **165**: 319–334.
- Petricka, J.J., Winter, C.M., and Benfey, P.N.** (2012). Control of *Arabidopsis* Root Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**: 563–590.
- Pfannschmidt, T., Bräutigam, K., Wagner, R., Dietzel, L., Schröter, Y., Steiner, S., and Nykytenko, A.** (2009). Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: Approaches towards better understanding. *Ann. Bot.* **103**: 599–

607.

- de Pinto, M.C., Locato, V., and de Gara, L.** (2012). Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell Environ.* **35**: 234–244.
- Pitzschke, A., Djamei, A., Bitton, F., and Hirt, H.** (2009). A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. *Mol. Plant* **2**: 120–137.
- Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A., and de la Torre-Ruiz, M.A.** (2006). Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **119**: 4554–4564.
- Pujol-Carrion, N. and De La Torre-Ruiz, M.A.** (2010). Glutaredoxins Grx4 and Grx3 of *Saccharomyces cerevisiae* play a role in actin dynamics through their trx domains, which contributes to oxidative stress resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 7826–7835.
- Pujol-Carrion, N. and Torre-Ruiz, M.A. de la** (2017). Physical interaction between the MAPK Slt2 of the PKC1-MAPK pathway and Grx3/Grx4 glutaredoxins is required for the oxidative stress response in budding yeast. *Free Radic. Biol. Med.* **103**: 107–120.
- Pukszta, S., Schilke, B., Dutkiewicz, R., Kominek, J., Moczulska, K., Stepien, B., Reitenga, K.G., Bujnicki, J.M., Williams, B., Craig, E.A., and Marszalek, J.** (2010). Co-evolution-driven switch of J-protein specificity towards an Hsp70 partner. *EMBO Rep.* **11**: 360–365.
- Pulido, P. and Leister, D.** (2018). Novel DNAJ-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **217**: 480–490.
- Qin, F. et al.** (2008). *Arabidopsis* DREB2A-Interacting Proteins Function as RING E3 Ligases and Negatively Regulate Plant Drought Stress-Responsive Gene Expression. *Plant Cell Online* **20**: 1693–1707.
- Qin, L., Wang, M., Zuo, J., Feng, X., Liang, X., and Wu, Z.** (2015). Cytosolic BolA Plays a Repressive Role in the Tolerance against Excess Iron and MV- Induced Oxidative Stress in Plants. *PLoS One*: 1–20.
- Qu, A.L., Ding, Y.F., Jiang, Q., and Zhu, C.** (2013). Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**: 203–207.
- Qu, Y. et al.** (2011). Thioredoxin-like 2 regulates human cancer cell growth and metastasis via redox homeostasis and NF- κ B signaling. *J. Clin. Invest.* **121**: 212–225.
- Quan, S. et al.** (2011). Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**: 262–269.

- Quan, S., Wang, L., Petrotchenko, E. V., Makepeace, K.A.T., Horowitz, S., Yang, J., Zhang, Y., Borchers, C.H., and Bardwell, J.C.A.** (2014). Super Spy variants implicate flexibility in chaperone action. *Elife* **2014**: 1–22.
- Queitsch, C., Hong, S.-W., Vierling, E., and Lindquist, S.** (2000). Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 479–492.
- Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoerberichts, F.A., Vandorpe, M., Gakière, B., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Van Breusegem, F., and 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 cel. *Plant J.* **52**: 640–657.
- Quon, T., Lampugnani, E.R., and Smyth, D.R.** (2017). PETAL LOSS and ROXY1 Interact to Limit Growth Within and between Sepals But to Promote Petal Initiation in Arabidopsis thaliana. *Front. Plant Sci.* **8**: 1–14.
- Reichheld, J.P., Meyer, E., Khafif, M., Bonnard, G., and Meyer, Y.** (2005). AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett.* **579**: 337–342.
- Rennenberg, H., Steinkamp, R., and Polle, A.** (1980). Evidence for the participation of a 5-oxo-prolinase in degradation of glutathione in nicotiana tabacum. *J. Biosci.* **35**: 708–711.
- Rey, P., Becuwe, N., Tourrette, S., and Rouhier, N.** (2017). Involvement of Arabidopsis glutaredoxin S14 in the maintenance of chlorophyll content. *Plant Cell Environ.* **40**: 2319–2332.
- 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.
- Rîssig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A.M., MÅlsch, A., and Dimmeler, S.** (1999). Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J. Biol. Chem.* **274**: 6823–6826.
- Rivera-Madrid, R., Mestres, D., Marinho, P., Jacquot, J.P., Decottignies, P., Miginiac-Maslow, M., and Meyer, Y.** (1995). Evidence for five divergent thioredoxin h sequences in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 5620–5624.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., and Mittler, R.** (2004).

- When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* **134**: 1683–1696.
- Rodríguez-Manzaneque, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., and Herrero, E.** (1999). Grx5 Glutaredoxin Plays a Central Role in Protection against Protein Oxidative Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 8180–8190.
- Rodríguez-Manzaneque, M.T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., and Herrero, E.** (2002). Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron/Sulfur Enzymes. *Mol. Biol. Cell* **13**: 1109–1121.
- Roldan-Arjona, T. and Ariza, R.R.** (2009). Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Zootaxa* **681**: 169–179.
- Roos, G. and Messens, J.** (2011). Protein sulfenic acid formation: From cellular damage to redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **51**: 314–326.
- Rouhier, N. et al.** (2007). Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 7379–7384.
- Rouhier, N., Cerveau, D., Couturier, J., Reichheld, J.P., and Rey, P.** (2015). Involvement of thiol-based mechanisms in plant development. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1850**: 1479–1496.
- Rouhier, N., Couturier, J., Johnson, M.K., and Jacquot, J.P.** (2010). Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* **35**: 43–52.
- Rouhier, N., Lemaire, S.D., and Jacquot, J.-P.** (2008). The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol* **59**: 143–66.
- ROUHIER, N., VILLAREJO, A., SRIVASTAVA, M., GELHAYE, E., KEECH, O., DROUX, M., FINKEMEIER, I., SAMUELSSON, G., DIETZ, K.J., JACQUOT, J.-P., and WINGSLE, G.** (2005). Identification of Plant Glutaredoxin Targets. *Antioxid. Redox Signal.* **7**.
- Ruelland, E. and Zachowski, A.** (2010). How plants sense temperature. *Environ. Exp. Bot.* **69**: 225–232.
- Rutherford, B.J., Dahl, R.H., Price, R.E., Szmidt, H.L., Benke, P.I., Mukhopadhyay, A., and Keasling, J.D.** (2010). Functional genomic study of exogenous n-butanol stress in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 1935–1945.

- Sablowski, R.** (2007). The dynamic plant stem cell niches. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 639–644.
- Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y.G., Maathuis, F.J.M., and Goloubinoff, P.** (2009). The Heat Shock Response in Moss Plants Is Regulated by Specific Calcium-Permeable Channels in the Plasma Membrane. *Plant Cell Online* **21**: 2829–2843.
- Saidi, Y., Peter, M., Fink, A., Cicekli, C., Vigh, L., and Goloubinoff, P.** (2010). Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca²⁺-dependent heat shock response. *Plant Signal. Behav.* **5**: 1530–1533.
- Sangwan, V., Örvar, B.L., Beyerly, J., Hirt, H., and Dhindsa Rajinder, S.** (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J.* **31**: 629–638.
- Schaller, G.E., Bishopp, A., and Kieber, J.J.** (2015). The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *Plant Cell Online* **27**: 44–63.
- Schauer, N., Steinhäuser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., Lundgren, K., Roessner-Tunali, U., Forbes, M.G., Willmitzer, L., Fernie, A.R., and Kopka, J.** (2005). GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett.* **579**: 1332–1337.
- Schilke, B., Williams, B., Knieszner, H., Pukszta, S., D’Silva, P., Craig, E.A., and Marszalek, J.** (2006). Evolution of Mitochondrial Chaperones Utilized in Fe-S Cluster Biogenesis. *Curr. Biol.* **16**: 1660–1665.
- Schippers, J.H.M., Foyer, C.H., and van Dongen, J.T.** (2016). Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Curr. Opin. Plant Biol.* **29**: 121–128.
- Schippers, J.H.M., Nguyen, H.M., Lu, D., Schmidt, R., and Mueller-Roeber, B.** (2012). ROS homeostasis during development: An evolutionary conserved strategy. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**: 3245–3257.
- Schirrmeister, B.E., de Vos, J.M., Antonelli, A., and Bagheri, H.C.** (2013). Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 1791–1796.
- Schmidt, R. and Schippers, J.H.M.** (2015). ROS-mediated redox signaling during cell differentiation in plants. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1850**: 1497–1508.
- Schöffl, F., Prandl, R., and Reindl, A.** (1998). Update on Signal Transduction Regulation of

- the Heat-Shock Response. *Plant Physiol.* **117**: 1135–1141.
- Schramm, F., Larkindale, J., Kiehlmann, E., Ganguli, A., Englich, G., Vierling, E., and Von Koskull-Döring, P.** (2008). A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. *Plant J.* **53**: 264–274.
- Schürmann, P. and Buchanan, B.B.** (2008). The Ferredoxin/Thioredoxin System of Oxygenic Photosynthesis. *Antioxid. Redox Signal.* **10**: 1235–1274.
- Schwarzländer, M., Fricker, M., Müller, C., Marty, L., Brach, T., Novak, J., Sweetlove, L., Hell, R., and Meyer, A.** (2008). Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J. Microsc.* **231**: 299–316.
- Sengupta, R. and Holmgren, A.** (2012). The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820**: 689–700.
- Serrato, A.J., Guilleminot, J., Meyer, Y., and Vignols, F.** (2008). AtCXXS: Atypical members of the Arabidopsis thaliana thioredoxin h family with a remarkably high disulfide isomerase activity. *Physiol. Plant.* **133**: 611–622.
- Shi, Z.-B., Ge, H.-H., Zhao, P., and Zhang, M.** (2010). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of recombinant VSP1 from Arabidopsis thaliana. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**: 201–3.
- Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Ullmann, P., Lill, R., and Kispal, G.** (2002). Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J. Biol. Chem.* **277**: 26944–26949.
- De Smet, I. et al.** (2008). Receptor-Like Kinase ACR4 Restricts Formative Cell Divisions in the Arabidopsis Root. *Science* (80-.). **322**: 594–597.
- De Smet, I. De et al.** (2007). Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**: 811–814.
- Smirnoff, N. and Critchley, C.** (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **355**: 1455–1464.
- Somssich, M., Khan, G.A., and Persson, S.** (2016). Cell Wall Heterogeneity in Root Development of Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **07**: 1–11.
- Stahl, Y., Wink, R.H., Ingram, G.C., and Simon, R.** (2009). A Signaling Module Controlling the Stem Cell Niche in Arabidopsis Root Meristems. *Curr. Biol.* **19**: 909–914.
- Staples, C.R., Ameyibor, E., Fu, W., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A.L., Schürmann, P.,**

- and Knaff, D.B.** (1996). The function and properties of the iron-sulfur center in spinach ferredoxin: Thioredoxin reductase: A new biological role for iron-sulfur clusters. *Biochemistry* **35**: 11425–11434.
- Staples, C.R., Gaymard, E., Stritt-Etter, A.L., Telser, J., Hoffman, B.M., Schürmann, P., Knaff, D.B., and Johnson, M.K.** (1998). Role of the [Fe₄S₄] cluster in mediating disulfide reduction in spinach ferredoxin:thioredoxin reductase. *Biochemistry* **37**: 4612–4620.
- Ströher, E., Grassl, J., Carrie, C., Fenske, R., Whelan, J., and Millar, A.H.** (2016). Glutaredoxin S15 is involved in Fe-S cluster transfer in mitochondria influencing lipoic acid-dependent enzymes, plant growth and arsenic tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **170**: 1284–1299.
- Stromer, T., Fischer, E., Richter, K., Haslbeck, M., and Buchner, J.** (2004). Analysis of the regulation of the molecular chaperone Hsp26 by temperature-induced dissociation: The N-terminal domain is important for oligomer assembly and the binding of unfolding proteins. *J. Biol. Chem.* **279**: 11222–11228.
- Stull, F., Koldewey, P., Humes, J.R., Radford, S.E., and Bardwell, J.C.A.** (2016). Substrate protein folds while it is bound to the ATP-independent chaperone Spy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**: 53–58.
- Su, P.-H. and Li, H.** (2008). Arabidopsis Stromal 70-kD Heat Shock Proteins Are Essential for Plant Development and Important for Thermotolerance of Germinating Seeds. *Plant Physiol.* **146**: 1231–1241.
- Sun, B., Xu, Y., Ng, K., Sun, B., Xu, Y., Ng, K., and Ito, T.** (2009). A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem. *GENES Dev.* **23**: 1791–1804.
- Sundaram, S. and Rathinasabapathi, B.** (2010). Transgenic expression of fern *Pteris vittata* glutaredoxin PvGrx5 in Arabidopsis thaliana increases plant tolerance to high temperature stress and reduces oxidative damage to proteins. *Planta* **231**: 361–369.
- Sundaram, S., Rathinasabapathi, B., Ma, L.Q., and Rosen, B.P.** (2008). An arsenate-activated glutaredoxin from the arsenic hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. regulates intracellular arsenite. *J. Biol. Chem.* **283**: 6095–6101.
- Sundaram, S., Wu, S., Ma, L.Q., and Rathinasabapathi, B.** (2009). Expression of a *Pteris*

- vittata glutaredoxin PvGRX5 in transgenic *Arabidopsis thaliana* increases plant arsenic tolerance and decreases arsenic accumulation in the leaves. *Plant, Cell Environ.* **32**: 851–858.
- Sundaravelpandian, K., Chandrika, N.N.P., and Schmidt, W.** (2013). PFT1, a transcriptional Mediator complex subunit, controls root hair differentiation through reactive oxygen species (ROS) distribution in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **197**: 151–161.
- Suzuki, N., Bajad, S., Shuman, J., Shulaev, V., and Mittler, R.** (2008). The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **283**: 9269–9275.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., and 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, M.A., and Mittler, R.** (2011). Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 691–699.
- Szenthe, A., Schäfer, H., Hauf, J., Schwend, T., and Wink, M.** (2007). Characterisation and expression of monosaccharide transporters in lupins, *Lupinus polyphyllus* and *L. albus*. *J. Plant Res.* **120**: 697–705.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., and Dong, X.** (2008). Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**: 952–6.
- Tanaka, T., Halicka, H.D., Huang, X., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z.** (2006). Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle* **5**: 1940–1945.
- Tapley, T.L., Franzmann, T.M., Chakraborty, S., Jakob, U., and Bardwell, J.C.A.** (2010). Protein refolding by pH-triggered chaperone binding and release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 1071–1076.
- Tavares, C.P., Vernal, J., Delena, R.A., Lamattina, L., Cassia, R., and Terenzi, H.** (2014). S-nitrosylation influences the structure and DNA binding activity of AtMYB30 transcription factor from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1844**: 810–817.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., and Hirt, H.** (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in

- Arabidopsis. *Mol. Cell* **15**: 141–152.
- Thelander, L. and Reichard, P.** (1979). Reduction of ribonucleotides. *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 133–158.
- Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S.L., Williams, B. a, Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., and Pachter, L.** (2010). Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nat. Biotechnol.* **28**: 511–515.
- Trivedi, D.K., Gill, S.S., Yadav, S., and Tuteja, N.** (2013). Genome-wide analysis of glutathione reductase (GR) genes from rice and Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* **8**: e23201-1–7.
- Tsukagoshi, H.** (2016). Control of root growth and development by reactive oxygen species. *Curr. Opin. Plant Biol.* **29**: 57–63.
- Tsukagoshi, H.** (2012). Defective root growth triggered by oxidative stress is controlled through the expression of cell cycle-related genes. *Plant Sci.* **197**: 30–39.
- Tu, B.P. and Weissman, J.S.** (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences. *J. Cell Biol.* **164**: 341–346.
- Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T.S., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J., and Bennett, M.J.** (2009). Gibberellin Signaling in the Endodermis Controls Arabidopsis Root Meristem Size. *Curr. Biol.* **19**: 1194–1199.
- Vanstraelen, M. and Benková, E.** (2012). Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**: 463–487.
- Varadarajan, J., Guillemot, J., Saint-Jore-Dupas, C., Piégu, B., Chabouté, M.-E., Gomord, V., Coolbaugh, R.C., Devic, M., and Delorme, V.** (2010). ATR3 encodes a diflavin reductase essential for Arabidopsis embryo development. *New Phytol.* **187**: 67–82.
- Vermeer, J.E.M. and Geldner, N.** (2015). Lateral root initiation in Arabidopsis thaliana: a force awakens. *F1000Prime Rep.* **7**: 1–7.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.-P., Muroy, A., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., Montagu, M. Van, Inzé, D., May, M.J., and Sung, Z.R.** (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**: 97–109.

- Vickery, L.E. and Cupp-Vickery, J.R.** (2007). Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**: 95–111.
- Vlami-Gardikas, A. and Holmgren, A.** (2002). Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods Enzymol.* **347**: 286–296.
- Volkov, R.A., Panchuk, I.I., Mullineaux, P.M., and Schöffl, F.** (2006). Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **61**: 733–746.
- Voth, W., Schick, M., Gates, S., Li, S., Vilardi, F., Gostimskaya, I., Southworth, D.R., Schwappach, B., and Jakob, U.** (2014). The protein targeting factor Get3 functions as ATP-Independent chaperone under oxidative stress conditions. *Mol. Cell* **56**: 116–127.
- Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J., and 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, S.A., Beli, P., Weinert, B.T., Nielsen, M.L., Cox, J., Mann, M., and Choudhary, C.** (2011). A Proteome-wide, Quantitative Survey of In Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles. *Mol. Cell. Proteomics* **10**: M111.013284.
- 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.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., and Foolad, M.R.** (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* **61**: 199–223.
- Walter, S. and Buchner, J.** (2002). Molecular Chaperones – Cellular Machines for Protein Folding. *Angew. Chemie Int. Ed.* **41**: 1098–1113.
- Wang, Y., Chang, H., Hu, S., Lu, X., Yuan, C., Zhang, C., Wang, P., Xiao, W., Xiao, L., Xue, G.P., and Guo, X.** (2014). Plastid casein kinase 2 knockout reduces abscisic acid (ABA) sensitivity, thermotolerance, and expression of ABA-and heat-stress-responsive nuclear genes. *J. Exp. Bot.* **65**: 4159–4175.
- Ward, J.M., Mäser, P., and Schroeder, J.I.** (2009). Plant Ion Channels: Gene Families, Physiology, and Functional Genomics Analyses. *Annu. Rev. Physiol.* **71**: 59–82.
- Waszczak, C., Carmody, M., and Kangasjarvi, J.** (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 209–236.

- Wegele, H., Müller, L., and Buchner, J.** (2004). Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. *Physiol Biochem Pharmacol* **151**: 1–44.
- Wendrich, J.R. and Weijers, D.** (2013). The Arabidopsis embryo as a miniature morphogenesis model. *New Phytol.* **199**: 14–25.
- Whippo, C.W., Khurana, P., Davis, P.A., Deblasio, S.L., Desloover, D., Staiger, C.J., and Hangarter, R.P.** (2011). THRUMIN1 is a light-regulated actin-bundling protein involved in chloroplast motility. *Curr. Biol.* **21**: 59–64.
- Wilkinson, B. and Gilbert, H.F.** (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1699**: 35–44.
- Winter, J., Ilbert, M., Graf, P.C.F., Ozcelik, D., and Jakob, U.** (2008). Bleach Activates a Redox-Regulated Chaperone by Oxidative Protein Unfolding. *Cell* **135**: 691–701.
- Winter, J., Linke, K., Jatzek, A., and Jakob, U.** (2005). Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol. Cell* **17**: 381–392.
- Wolosiuk, R. a and Buchanan, B.B.** (1978). Activation of Chloroplast NADP-linked Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase by the Ferredoxin/Thioredoxin System. *Plant Physiol.* **61**: 669–71.
- Wood, Z.A., Schröder, E., Harris, J.R., and Poole, L.B.** (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 32–40.
- Wu, Q., Hu, Y., Sprague, S.A., Kakeshpour, T., Park, J., Nakata, P.A., Cheng, N., Hirschi, K.D., White, F.F., and Park, S.** (2017). Expression of a monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, in tomato (*Solanum lycopersicum*) enhances drought tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **491**: 1034–1039.
- Wu, Q., Lin, J., Liu, J.Z., Wang, X., Lim, W., Oh, M., Park, J., Rajashekar, C.B., Whitham, S.A., Cheng, N.H., Hirschi, K.D., and Park, S.** (2012). Ectopic expression of Arabidopsis glutaredoxin AtGRXS17 enhances thermotolerance in tomato. *Plant Biotechnol. J.* **10**: 945–955.
- Xing, S., Rosso, M.G., and Zachgo, S.** (2005). ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**: 1555–1565.
- Xing, S. and Zachgo, S.** (2008). ROXY1 and ROXY2, two Arabidopsis glutaredoxin genes, are required for anther development. *Plant J.* **53**: 790–801.

- Yamada, K., Fukao, Y., Hayashi, M., Fukazawa, M., Suzuki, I., and Nishimura, M.** (2007). Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **282**: 37794–37804.
- Yamada, K., Osakabe, Y., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2017). A C-terminal motif contributes to the plasma membrane localization of *Arabidopsis* STP transporters. *PLoS One* **12**: 1–13.
- Yamada, M. and Sawa, S.** (2013). The roles of peptide hormones during plant root development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**: 56–61.
- Ye, H., Abdel-Ghany, S.E., Anderson, T.D., Pilon-Smits, E.A.H., and Pilon, M.** (2006). CpSufE activates the cysteine desulfurase CpNifS for chloroplastic Fe-S cluster formation. *J. Biol. Chem.* **281**: 8958–8969.
- Yeh, C.H., Kaplinsky, N.J., Hu, C., and Charng, Y. yung** (2012). Some like it hot, some like it warm: Phenotyping to explore thermotolerance diversity. *Plant Sci.* **195**: 10–23.
- Yoshida, T. et al.** (2011). *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol. Genet. Genomics* **286**: 321–332.
- Yruela, I.** (2015). Plant development regulation : Overview and perspectives. *J. Plant Physiol.* **182**: 62–78.
- Yu, H. et al.** (2017). *Arabidopsis* Glutaredoxin S17 Contributes to Vegetative Growth, Mineral Accumulation, and Redox Balance during Iron Deficiency. *Front. Plant Sci.* **8**: 1–11.
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Couturier, J., Gao, X.-H., Rouhier, N., Trost, P., and Lemaire, S.D.** (2012a). Glutaredoxin S12: Unique Properties for Redox Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **16**: 17–32.
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Morisse, S., Trost, P., and Lemaire, S.D.** (2012b). Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Focus on Glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **16**: 567–586.
- Zander, M., Chen, S., Imkampe, J., Thurow, C., and Gatz, C.** (2012). Repression of the *Arabidopsis thaliana* jasmonic acid/ethylene-induced defense pathway by tga-interacting glutaredoxins depends on their c-terminal alwl motif. *Mol. Plant* **5**: 831–840.
- Zannini, F., Roret, T., Przybyla-toscano, J., Dhalleine, T., and Rouhier, N.** (2018). Mitochondrial *Arabidopsis thaliana* TRXo Isoforms Bind an Iron – Sulfur Cluster and

Reduce NFU Proteins In Vitro.: 1–21.

Zhang, X., Wu, Q., Cui, S., Ren, J., Qian, W., Yang, Y., He, S., Chu, J., Sun, X., Yan, C., Yu, X., and An, C. (2015). Hijacking of the jasmonate pathway by the mycotoxin fumonisin B1 (FB1) to initiate programmed cell death in Arabidopsis is modulated by RGLG3 and RGLG4. *J. Exp. Bot.* **66**: 2709–2721.

Zhang, X., Wu, Q., Ren, J., Qian, W., He, S., Huang, K., Yu, X., Gao, Y., Huang, P., and An, C. (2012). Two Novel RING-Type Ubiquitin Ligases, RGLG3 and RGLG4, Are Essential for Jasmonate-Mediated Responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **160**: 808–822.

Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., and Voellmy, R. (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* **94**: 471–480.

Zuo, J., Wu, Z., Li, Y., Shen, Z., Feng, X., Zhang, M., and Ye, H. (2017). Mitochondrial ABC Transporter ATM3 Is Essential for Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly. *Plant Physiol.* **173**: 2096–2109.

Résumé

L'adaptation des plantes face au stress thermique est cruciale pour leur survie et implique des réponses spécifiques telles que l'induction de protéines chaperonnes et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les glutaredoxines (GRX), une famille de protéines thiol anti-oxydantes, jouent un rôle important dans la régulation redox et la réponse au stress oxydatif. Mes études se concentrent sur GRXS17, une protéine multi-domaine à cœur fer-soufre. Malgré un phénotype de développement sévère du mutant *grxs17* à des températures normales et plus élevées, peu est connu sur les fonctions biochimiques et les rôles intracellulaires précis de GRXS17. J'ai montré au cours de ma thèse que GRXS17 fonctionne comme une chaperonne dépendante de l'oxydation de la cellule. Elle présente à la fois une activité de type foldase mais également holdase. L'exposition aux stress oxydatif et thermique provoque le passage d'une forme dimérique à des complexes à poids moléculaires élevés ce qui est consistant avec une activité holdase. J'ai également montré que GRXS17 est requis pour la tolérance à des hausses de température de manière dépendante de ses cystéines catalytiques. Des approches de transcriptomique, métabolomique et protéomique montrent une réponse au stress thermique retardée dans le mutant *grxs17*, des défauts dans l'accumulation de certains métabolites clés, et ont permis d'identifier de potentiels nouveaux interactants de GRXS17 dans des conditions de stress thermique. Ces éléments soutiennent la fonction chaperonne de GRXS17 dans des conditions normales et de stress thermiques.

Mots clés : Glutarédoxine, croissance racinaire, stress thermique, thermotolérance, activité chaperonne, *Arabidopsis thaliana*

Abstract

Adaption of plants to heat stress is crucial for their survival and involves dedicated response such as chaperones proteins induction and production of reactive oxygen species (ROS). Glutaredoxins (GRX), a family of thiol redox proteins, play an important role in redox regulation and response to oxidative stress. The focus of our studies is on GRXS17 which is a multi-subunit iron-sulfur glutaredoxin. Despite the severe developmental phenotype of the *grxs17* mutant at normal and elevated temperatures, relatively little is known about the biochemical functions and precise intracellular roles of GRXS17. I show during my thesis that GRXS17 function as a foldase and holdase redox-dependent chaperone. Oxidative and heat stress exposure cause a shift from a dimeric form to high MW complexes which is concordant with a holdase activity. I show that GRXS17 is required for the tolerance to moderated heat stress in a Cys-dependent manner. Transcriptomic, metabolomic and proteomic approaches show heat stress response delayed in *grxs17*, key-metabolites defects and allowed to identify new potential GRXS17-interactor under heat stress conditions, supporting a potential protecting function of GRXS17 against stress damage.

Keywords: glutaredoxin, root development, heat stress, thermotolerance, chaperone activity, *Arabidopsis thaliana*