HAL
open science

Caractérisation biochimique et fonctionnelle de glutathion transférases à cystéine catalytique de peuplier (Populus trichocarpa)

Pierre-Alexandre Lallement

To cite this version:

Pierre-Alexandre Lallement. Caractérisation biochimique et fonctionnelle de glutathion transférases à cystéine catalytique de peuplier (Populus trichocarpa). Sylviculture, foresterie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0275 . tel-01751317

HAL Id: tel-01751317

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751317

Submitted on 29 Mar 2018

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Collégium Sciences & Technologies
ED Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Biologie Végétale et Forestière

IFR 110 EFABA
Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés et Alimentation
UMR INRA/UL 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine
en Biologie Végétale et Forestière

Par

Pierre-Alexandre LALLEMENT

Caractérisation biochimique et fonctionnelle de glutathion transférases à cystéine catalytique de peuplier (*Populus trichocarpa*)

Soutenance prévue le 12 décembre 2014

Membres du Jury:

Rapporteurs	**Dr. Stéphane LEMAIRE**	DR. CNRS, Paris
	Dr. Danièle WERCK-REICHHART	DR. CNRS, Strasbourg
Examinateurs	**Dr. Fabrice NEIERS**	MCF. Université de Bourgogne
	Pr. Sandrine BOSCHI-MULLER	PR. Université de Lorraine
Directeurs de thèse	**Pr. Nicolas ROUHIER**	PR. Université de Lorraine
	Dr. Arnaud HECKER	MCF. Université de Lorraine
Invité	**Dr. Claude DIDIERJEAN**	MCF. Université de Lorraine

Collégium Sciences & Technologies
ED Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Biologie Végétale et Forestière

IFR 110 EFABA
Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés et Alimentation
UMR INRA/UL 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine
en Biologie Végétale et Forestière

Par

Pierre-Alexandre LALLEMENT

Caractérisation biochimique et fonctionnelle de glutathion transférases à cystéine catalytique de peuplier (*Populus trichocarpa*)

Soutenance prévue le 12 décembre 2014

Membres du Jury:

Rapporteurs	**Dr. Stéphane LEMAIRE**	DR. CNRS, Paris
	Dr. Danièle WERCK-REICHHART	DR. CNRS, Strasbourg
Examinateurs	**Dr. Fabrice NEIERS**	MCF. Université de Bourgogne
	Pr. Sandrine BOSCHI-MULLER	PR. Université de Lorraine
Directeurs de thèse	**Pr. Nicolas ROUHIER**	PR. Université de Lorraine
	Dr. Arnaud HECKER	MCF. Université de Lorraine
Invité	**Dr. Claude DIDIERJEAN**	MCF. Université de Lorraine

Résumé : Les glutathion transférases (GSTs) constituent une superfamille ubiquitaire d'enzymes multifonctionnelles impliquées dans les processus de détoxication cellulaire en métabolisant des substrats exogènes appelés xénobiotiques et dans le métabolisme secondaire. Pour cela, ces enzymes peuvent catalyser la conjugaison d'une molécule de glutathion (GSH) sur les composés ciblés ou simplement les lier au travers d'une fonction ligandine. Alors que la fonction de conjugaison est catalysée par les GSTs possédant une sérine ou une tyrosine comme résidu catalytique, certaines d'entre elles possèdent à la place une cystéine. Cette substitution change radicalement leurs propriétés puisque les GSTs à cystéine (Cys-GSTs) catalysent plutôt des réactions de déglutathionylation. Les Cys-GSTs sont retrouvées chez la plupart des organismes et sont réparties en plusieurs classes. Chez les plantes, on trouve principalement 4 classes : déshydroascorbate réductases (DHARs), GSTs Lambda (GSTLs), glutathionyl hydroquinone réductases (GHRs) et mPGES2 (microsomal prostaglandine E-synthase type 2). Alors que le rôle des DHARs semble clairement associé à la réduction du déshydroascorbate en ascorbate, la fonction physiologique des autres Cys-GSTs reste majoritairement inconnue. En combinant des approches moléculaires, cellulaires, biochimiques et structurales, l'analyse fonctionnelle des deux GHRs, des trois GSTLs et des trois DHARs chez l'arbre modèle Populus trichocarpa a été entreprise. De façon intéressante, les gènes GSTL et GHR sont majoritairement exprimés dans les fleurs, les fruits et les pétioles par rapport aux feuilles et aux racines. A l'inverse, les gènes DHAR sont principalement exprimés dans les feuilles. De plus, l'expression transitoire de protéines fusionnées à la GFP dans le tabac a montré que les GSTLs et les DHARs sont localisées dans les plastes, le cytoplasme et le noyau alors que les GHRs sont toutes plastidiales. Les études biochimiques et structurales effectuées à l'aide des protéines recombinantes et de substrats modèles ont montré que la plupart des Cys-GSTs possèdent des activités et des structures assez semblables. Cependant, bien que les GSTLs et les DHARs adoptent un repliement GST canonique classique proche de celui des GSTs Oméga fongiques et humaines, elles sont monomériques alors que les GSTs Oméga sont dimériques. Les GHRs sont particulières tant au niveau de leur interface de dimérisation unique qu'au niveau de leurs propriétés spécifiques de réduction de quinones glutathionylées. En résumé, la nature des substrats fixés par les Cys-GSTs (composés cycliques aromatiques) ainsi que les territoires d'expression de ces gènes et protéines suggèrent que ces protéines sont globalement impliquées dans la protection des plantes face aux contraintes environnementales via la modification, le stockage et/ou le transport de métabolites secondaires et autres composés antioxydants. Toutefois, l'objectif suivant sera de déterminer la nature exacte des substrats/ligands associés à chaque enzyme.

Mots clés : glutathion transférases, cystéine catalytique, Populus trichocarpa, déglutathionylation, structures cristallographiques, détoxication, espèces oxygénées réactives, métabolisme secondaire

Abstract: Glutathione transferases (GSTs) constitute a ubiquitous superfamily of multifunctional enzymes involved in cellular detoxification processes by metabolizing exogenous substrates called xenobiotics and in secondary metabolism. For this purpose, these enzymes catalyze the conjugation of a glutathione molecule (GSH) onto target compounds or simply bind them through a ligandin function. While conjugation reactions are catalyzed by GSTs having a serine or a tyrosine as catalytic residues, other GSTs possess a cysteine. This substitution radically changes their properties since GSTs having a cysteine (Cys-GSTs) rather catalyze deglutathionylation reactions. Cys-GSTs are found in most organisms and are divided into several classes. In plants, there are mainly four classes: dehydroascorbate reductases (DHARs), Lambda GSTs (GSTLs), glutathionyl hydroquinone reductases (GHRs), and microsomal prostaglandin E-synthase type 2 (mPGES). While the role of DHARs seems clearly associated to the reduction of dehydroascorbate into ascorbate, the physiological function of other Cys-GSTs remains largely unknown. By combining molecular, cellular, biochemical and structural approaches, the functional analysis of the two GHRs, the three GSTLs and the three DHARs in the model tree Populus trichocarpa was undertaken. Interestingly, GSTL and GHR genes are predominantly expressed in flowers, fruits and petioles compared to leaves and roots. Conversely, the DHAR genes are mainly expressed in leaves. Furthermore, transient expression of proteins fused to GFP in tobacco showed that GSTLs and DHARs are localized in plastids, cytoplasm and nucleus while GHRs are all localized in plastids. Biochemical and structural studies using recombinant proteins and model substrates showed that most Cys-GSTs have similar activities and structures. However, although GSTLs and DHARs adopt a canonical GST folding similar to that of fungal and human Omega GSTs, they are monomeric whereas Omega GSTs are dimeric. GHRs are particular owing to their unique dimerization interface and to their specific capacity to reduce glutathionylated quinones. In summary, the nature of the substrates bound by Cys-GSTs (heterocyclic aromatic compounds) as well as the expression territories of these genes and proteins, suggest that they are generally involved in the protection of plants towards environmental constraints through the modification, storage and/or transport of secondary metabolites and other antioxidants. However, the next goal will be to determine the exact nature of the substrates/ligands associated with each enzyme.

Key words: glutathione transferases, catalytic cysteine, Populus trichocarpa, deglutathionylation, crystal structures, detoxification, reactive oxygen species, secondary metabolism

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Stéphane Lemaire, Sandrine Boschi-Muller, Fabrice Neiers et Danièle Werck-Reichhart d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux de thèse. Je souhaiterais également remercier les personnes qui ont collaboré avec moi au cours de ces trois années de thèse, José M. Gualberto, Claude Didierjean, Frederick Saul, Ahmed Haouz, Stéphane Dumarcay, Frédérique Favier, Alexandre Olry, Bastiaan Brouwer, Olivier Keech et François Dupire, notamment pour leurs idées et leur intérêt pour ces travaux.

Mes plus sincères remerciements sont adressés à mes directeurs de thèse, Nicolas Rouhier et Arnaud Hecker qui m'ont permis de réaliser cette thèse non seulement dans de bonnes conditions mais surtout de la réaliser tout court. Je vous remercie pour votre confiance et la grande autonomie que vous m'avez accordées, pour votre disponibilité de tout instant, que se soit pour des questions pratiques comme scientifiques, et pour la patience dont vous avez su faire preuve depuis mon arrivée au laboratoire. Je vous remercie également pour vos encouragements et votre bonne humeur qui, sans eux, auraient rendu ce parcours beaucoup moins humain. Ce côté humain dont vous avez fait preuve durant ces trois années, sous quelque forme que ce soit, est une qualité rare qu'il se doit d'être signalé. Merci à vous deux de m'avoir fait vivre ces instants inoubliables qui se sont écoulés trop vite. Merci également pour votre réactivité, pour votre soutien et pour les corrections de ce manuscrit durant cette période délicate de fin thèse. J'ai beaucoup de respect pour vous et ce fut un plaisir, un honneur, de travailler avec vous.

J'adresse un remerciement tout particulier à mon ami Edgar. Merci pour tout ce que tu m'as appris, pour ta rigueur et ton professionalisme mais surtout pour ton amitié et tous les à cotés. Les soirées jeux vidéos et karaoké (merci Céline), les fast-foods, les sorties et tes séances de trashing.

Je tiens également à remercier tous ceux avec qui j'ai partagé de long moments dans mes différents bureaux, Benji pour ton humour toujours en finesse et tes sorties dans les Vosges en plein été, Henri pour tes petits bras, ta chevelure dense et ton capitalisme à toute épreuve, Yann pour ton intérêt si particulier pour la musique calme et relaxante, Jonathan pour ton amour des mobylettes et du tunning de couleur jaune, ainsi que Anne et Aurélie

(pour tes prises de position contre la technologie) pour vos touches de féminités et votre patience dans ces bureaux testostéronés.

Je tiens à remercier chaleureusement tous mes collègues et amis avec qui j'ai partagé cette expérience de près comme de loin aucours de discussions autour d'un café, de BBQ mémorables ou des séances de sports très intensives : Mélanie, Eric, Jean-Pierre, Rodnay, Tiphaine, Fanny (t'es encore là toi ?), Jérémy, Aude, Kamel, Chantal, Antoine, Béatrice, et Raphaël.

Plus personnellement, j'aimerai remercier mon cousin Benjamin avec qui je partage ma vie quotidienne depuis bientôt 10 ans déjà. Merci pour ces merveilleuses années de colocation que l'on a passées ensemble, pour tous les fous rires et les délires, jour après jour et en soirée. Merci pour ce soutien au quotidien et celui de ces dernières semaines.

J'adresse également un immense merci aux membres de ma famille qui m'ont toujours soutenu au cours de ma vie même dans les moments les plus difficiles. Sans vous, ces études n'auraient jamais eu lieu.

Enfin, mes derniers mots vont à mes parents. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté depuis toujours, pour me supporter dans les périodes délicates, votre amour inconditionnel et pour les encouragements que vous me donnez continuellement. Je vous dédie cette thèse.

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

Asc : Ascorbate

ATP : Adénosine triphosphate

CoA : Coenzyme A

Cys-GST : Glutathion transférase à cystéine catalytique

DHA : Déshydroascorbate

DHAR : Déshydroascorbate réductase

DMAPP : Diméthylallyl pyrophosphate

DsbA : Disulfide bond A

EOR : Espèce oxygénée réactive

GHR : Glutathionyl-hydroquinone réductases

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

GST : Glutathion transférase

GSTL : Glutathion transférase Lambda

GSTO : Glutathion transférase Oméga

HED : Hydroxyéthyl disulfide

IPP : Isopentényl diphosphate

MAPEG : Membrane associated proteins in eicosanoids and glutathione metabolism

MDHA : Monodéshydroascorbate

MEP : Voie du méthyl-érythritol phosphate

mPGES2 : Microsomal prostaglandine E-Synthase type 2

MVA : Voie du mevalonate

PDB : Protein data bank

PSI/II : Photosystème I/II

SOD : Superoxyde dismutase

NAD(P)H : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit

RuBisCO : Ribulose-1,5-bisphophate carboxylase/oxygénase

UV : Ultra-violet

Table des matières

Table des matières

REMERCIEMENTS **9**

ABREVIATIONS **13**

TABLE DES MATIERES **17**

INTRODUCTION **21**

LES ESPECES OXYGENEES REACTIVES CHEZ LES PLANTES **30**

1. LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE 30
2. CONSEQUENCES PRINCIPALES DES EORS SUR LA CELLULE ET LES SYSTEMES CELLULAIRES MAJEURS DE NEUTRALISATION 35
   - *a. Les EORs et la signalisation cellulaire* *35*
   - *b. L'oxydation des protéines* *37*
   - *c. La modification des lipides par les EORs et conséquences sur l'intégrité membranaire* *39*
   - *d. L'altération des acides nucléiques* *40*
3. STRATEGIE DE CONTROLE DES EORS PAR LA CELLULE 42

PRINCIPALES MOLECULES ANTIOXYDANTES ET SYSTEMES ENZYMATIQUES DE DETOXICATION DES EORS **44**

1. GLUTATHION ET ASCORBATE : MOLECULES MAJEURES DU CONTROLE REDOX DE L'ENVIRONNEMENT CELLULAIRE 44
   - *a. Le glutathion* *44*
   - *b. L'ascorbate ou vitamine C* *47*
2. PRINCIPAUX METABOLITES SECONDAIRES IMPLIQUES DANS LA GESTION DU STRESS OXYDANT 52
   - *a. Les terpènes et terpènoïdes* *52*
     - i. Les caroténoïdes 55
     - ii. Vitamine E : tocophérols et tocotriénols 60
   - *b. Composés phénoliques et polyphénols* *63*
     - i. Les flavonoïdes 65
     - ii. Les coumarines 72
     - iii. Les stilbénoïdes 76
3. CONTROLE REDOX ENZYMATIQUE CHEZ LES PLANTES 79
   - *a. Les catalases* *79*
   - *b. Les superoxyde dismutases* *80*
   - *c. Les enzymes à repliement thiorédoxine* *82*
4. **ARTICLE 1 : REDOX REGULATION IN PLANTS: GLUTATHIONE AND « REDOXIN » RELATED FAMILIES** 82

LES GLUTATHION S-TRANSFERASES **102**

1. HISTORIQUE 102
2. LES TROIS TYPES DE GSTS : SIMILITUDES ET DIFFERENCES 102
3. LES GSTS : OBJET DE L'ETUDE 104
   - *a. Evolution* *104*
   - *b. Structure des GSTs* *108*
     - i. Cas général de la structure typique 108
     - ii. Cas des structures atypiques 113
     - iii. Cas particulier des GSTs Kappa et MAPEG 115

IMPLICATION DES GSTS DANS LE METABOLISME CELLULAIRE **120**

1. LA GLUTATHIONYLATION 120
2. L'ISOMERISATION DE METABOLITES SPECIFIQUES 123
3. LES GSTS ET LE STRESS OXYDANT 124
4. LA DEGLUTATHIONYLATION 126

5.L'ACTIVITE LIGANDINE, FONCTION NON CATALYTIQUE DES GSTS 128

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS 133

RESULTATS 139

1.**ARTICLE 2 : THE STILL MYSTERIOUS ROLES OF CYSTEINE-CONTAINING GLUTATHIONE TRANSFERASES IN PLANTS** 139

2. **ARTICLE 3 : STRUCTURAL AND ENZYMATIC INSIGHTS INTO LAMBDA GLUTATHIONE TRANSFERASES FROM *POPULUS TRICHOCARPA*, MONOMERIC ENZYMES CONSTITUTING AN EARLY DIVERGENT CLASS SPECIFIC TO TERRESTRIAL PLANTS** 163

3. **ARTICLE 4 : GLUTATHIONYL-HYDROQUINONE REDUCTASES FROM POPLAR ARE PLASTIDIAL PROTEINS WHICH DEGLUTATHIONYLATE GLUTATHIONE-CONJUGATED REDUCED AND OXIDIZED QUINONES** 187

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 221

1.CARACTERISTIQUES DE SEQUENCE, PHYLOGENIE ET EVOLUTION DES GSTS A CYSTEINE CATALYTIQUE 221

2.PROPRIETES BIOCHIMIQUES ET STRUCTURALES DES CYS-GSTS DE PEUPLIER 226

3.FONCTIONS CELLULAIRES SUPPOSEES DES CYS-GSTS CHEZ LES PLANTES 235

4. LA RECHERCHE DES SUBSTRATS PHYSIOLOGIQUES DES CYS-GSTS CHEZ LES PLANTES : UNE ETAPE SUPPLEMENTAIRE PRIMORDIALE POUR LA COMPREHENSION DE LEUR ROLE. 238

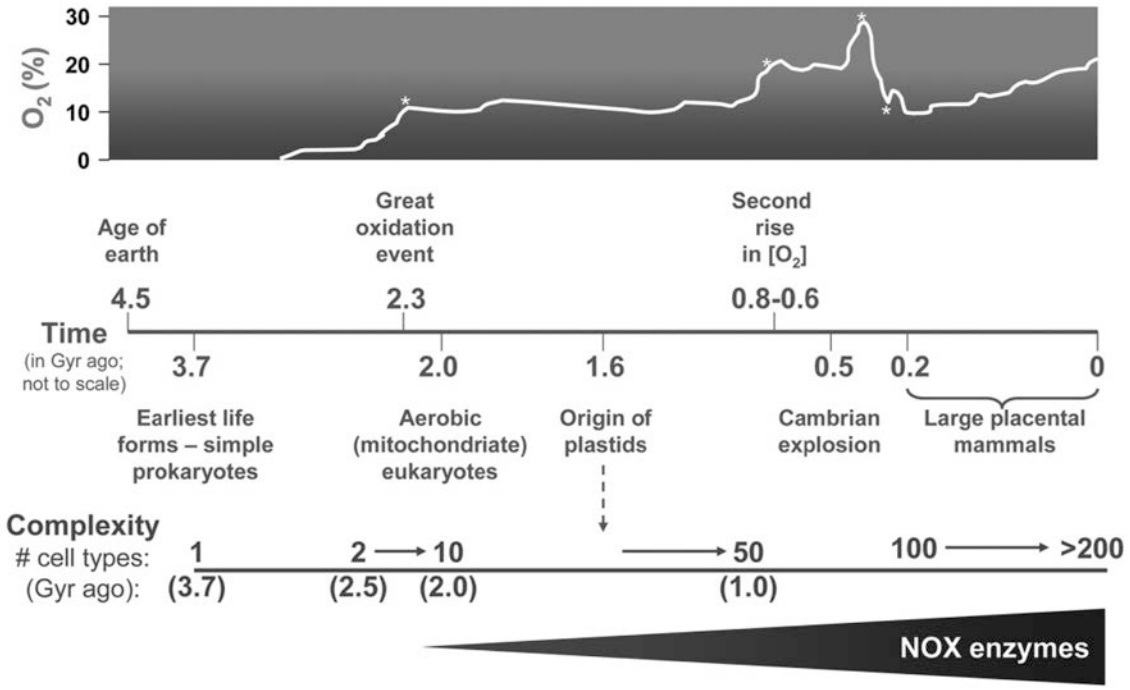
REFERENCES 247

Introduction

Introduction

La Terre ainsi que le système solaire se sont formés il y a environ 4,5 milliards d'années. Les origines de la vie sur Terre demeurent incertaines mais semblent remonter à au moins 3,5-3,8 milliards d'années avant la découverte des stromatolithes, premières traces de vie identifiées sur terre. Les stromatolithes, roches calcaires très anciennes datées de -3,5 milliards d'années, ont été trouvées dans des lagunes de l'ouest australien dans la région de Warrawoona. De nos jours, des roches similaires sont fabriquées par des communautés bactériennes où dominent les cyanobactéries, micro-organismes unicellulaires capables de produire par photosynthèse de la matière organique à partir de l'énergie solaire tout en dégageant du dioxygène (O_2). Par analogie, il est considéré que les stromatolithes anciens ont dû être produits par des organismes proches. Cette hypothèse a été appuyée par la découverte de terrains âgés de 2,5 milliards d'années, en bordure du lac Supérieur (formation sédimentaire de Gunflint située dans le nord du Minnesota aux Etats-Unis et le nord-ouest de l'Ontario au Canada), ayant fossilisé des cyanobactéries proches du groupe actuel des *Nostoc*. La production d'O_2 a eu un impact important et décisif sur l'évolution de la vie puisqu'elle a conduit à « La Grande Oxydation », également appelée « catastrophe de l'oxygène » ou encore « crise de l'oxygène », qui a eu lieu dans les océans et l'atmosphère il y a environ 2,4 milliards d'années (Figure 1). En effet, au cours de ce phénomène, l'O_2 produit par ces cyanobactéries ancestrales s'est rapidement accumulé provoquant ainsi une crise écologique en raison de sa toxicité pour les organismes anaérobies de l'époque qui le produisaient. Néanmoins, la concentration en O_2 de l'air continua d'augmenter rapidement (en à peine deux cent millions d'années, soit vers -2,1 milliards d'années, la concentration en O_2 atteint le seuil de 4 %) et conduisit à l'émergence de la vie aérobie (Figure 1). En effet, par endosymbiose d'une α-protéobactérie, il y a environ 2 milliards d'années, une cellule proto-eucaryote a acquis la faculté d'utiliser l'O_2 présent sur Terre. La théorie endosymbiotique de l'origine des mitochondries, a été développée et argumentée par les travaux de Lynn Margulis dans les années 1960, puis a été appuyée par la découverte de l'ADN mitochondrial en 1980 (Figure 2). Au cours de l'évolution, l'ADN originel de la bactérie a semble-t-il subi diverses évolutions telles que la perte d'un grand nombre de gènes transférés dans l'ADN nucléaire de la cellule hôte. Parallèlement à ce report de la synthèse de certaines protéines vers le système nucléaire, la cellule a développé un arsenal de translocases, enzymes permettant le transfert de ces protéines vers la matrice mitochondriale. Cette endosymbiose a été considérable pour

le développement de la vie puisqu'elle a contribué à améliorer de façon remarquable le métabolisme énergétique de la cellule.



<u>Figure 1 :</u> Relations temporelles entre concentration atmosphérique estimée de dioxygène (O_2), diversification évolutive et complexité biologique ((Thannickal 2009)).

La première période d'accumulation rapide d'O_2 s'est produite il y a environ 2,3 milliards années (événement correspondant à « La Grande Oxydation », premier astérisque) et a été suivie par l'apparition des eucaryotes aérobies multicellulaires (apparition des mitochondries). L'apparition des plastes, il y a environ 1,6 milliards d'années, a fourni aux eucaryotes aérobies la capacité de produire leur propre O_2 et semble avoir déclenché une deuxième phase d'expansion des organismes multicellulaires (passage de 10 à 50 types cellulaires entre 1,5 et 1,0 milliard d'années). La deuxième augmentation importante de la concentration d'O_2 atmosphérique a eu lieu entre 0,8 et 0,6 milliard d'années (désignée par le deuxième astérisque). Cette augmentation a eu un impact important durant la période cambrienne, il y a 0,54 milliard d'années. Elle est associée à une période de spéciation plus rapide et plus prolifique des organismes vivants. Une troisième hausse de la concentration en O_2 atmosphérique (niveaux supérieurs à 30 %) a eu lieu il y a environ 0,3 milliard d'années (désignée par le troisième astérisque). Cette augmentation est liée à l'émergence du «gigantisme» dans plusieurs groupes d'arthropodes et de reptiles. La baisse rapide de la concentration d'O_2 qui a suivi (il y a 240 à 260 millions d'années, quatrième astérisque) a conduit à des extinctions de masse de ces espèces. L'augmentation régulière de la concentration d'O_2 (passage d'environ 10 % à 21 % au cours des 205 derniers millions d'années) semble être un facteur clé dans l'évolution des grands mammifères placentaires. Des enzymes de réduction de l'O_2 (NADPH oxydases (NOX)) sont apparues chez les eucaryotes aérobies et le nombre de ces homologues s'est probablement accru avec l'augmentation de la complexité cellulaire.

Dans des conditions dites anaérobies, le processus de fermentation de la cellule, au travers de la glycolyse, ne produit que 2 moles d'adénosine triphosphate (ATP) pour une mole de glucose. En revanche, dans des conditions aérobies, cette production passe à 38. En effet, le pyruvate, produit final de la glycolyse, est par la suite utilisé comme précurseur réactionnel du cycle du citrate (cycle de Krebs) des mitochondries, permettant ainsi la synthèse de 36 moles d'ATP supplémentaires. Le rendement a ainsi été multiplié par 19. (Figure 3). Ainsi, la vie aérobie (utilisant l'oxygène atmosphérique libre), majoritaire sur la planète, résulte de l'adaptation de la vie primitive anaérobie à un environnement qu'elle a rendu toxique. Un peu plus tard, il y a 1,5 ou 1,6 milliard d'années, une cellule eucaryote ancestrale comportant des mitochondries a intégré une cyanobactérie ancestrale photosynthétique à l'origine des chloroplastes actuels, siège de la photosynthèse (Figures 1 et 2).

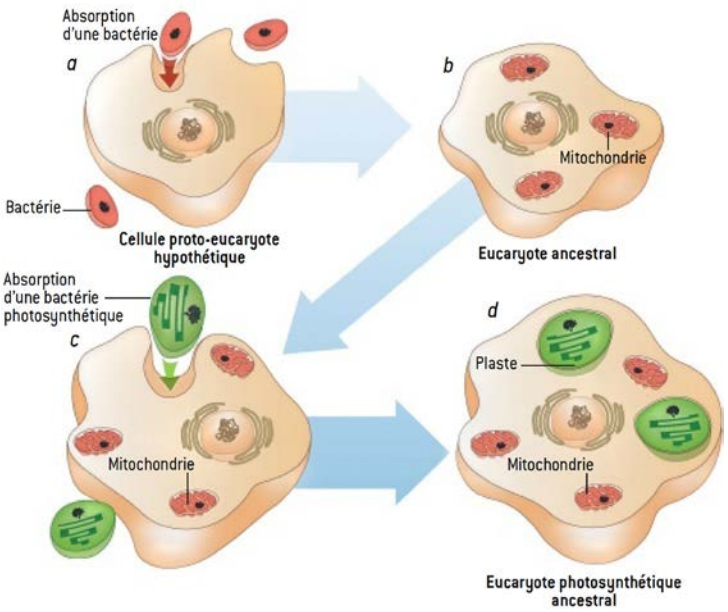
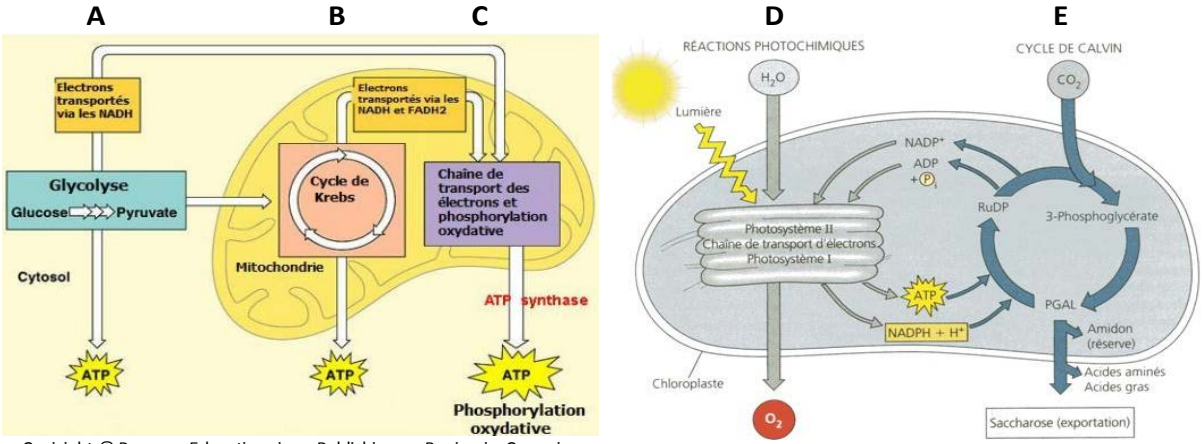


Figure 2 : Théorie endosymbiotique, ou hypothèse de l'endosymbiose ((Selosse 2011)).
La théorie endosymbiotique, ou hypothèse de l'endosymbiose, est l'hypothèse selon laquelle une cellule proto-eucaryote hypothétique ancestrale a un jour absorbé une α-protéobactérie ancestrale (a) à l'origine des mitochondries, donnant l'ancêtre des eucaryotes actuels (b). Par la suite, l'absorption d'une cyanobactérie ancestrale photosynthétique (c) à l'origine des plastes, par une cellule eucaryote ancestrale, a conduit à l'ancêtre des végétaux actuels (d).

La photosynthèse ou synthèse par la lumière correspond à un ensemble de réactions biochimiques dont le bilan est la production de molécules organiques (à base de glucose) et de dioxygène à partir de lumière, de dioxyde de carbone et d'eau. Elle se réalise en deux grandes phases appelées phase claire et phase sombre (Figure 3). La phase claire correspond

à un ensemble de réactions photochimiques, donc dépendantes de la lumière, qui conduisent à la production d'ATP et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) par l'intermédiaire du transport d'électrons au travers de photosystèmes. Cette phase permet ainsi la conversion d'énergie lumineuse en énergie chimique. Au cours de la phase sombre, l'ATP et le NADPH emmagasinés lors de la phase claire sont utilisés pour la conversion du CO_2 et de l'eau en glucides. Cette seconde phase, qui permet l'assimilation du gaz carbonique atmosphérique, correspond à une phase entièrement enzymatique, appelée cycle de Calvin. Au final, environ 30 % de l'énergie lumineuse absorbée sont stockés sous forme de matière organique (Figure 3). L'acquisition de la photosynthèse par ces cellules eucaryotes primitives a donc contribué au développement du métabolisme énergétique de la cellule. En effet, elle a non seulement permis une production accrue d'ATP mais aussi l'apparition de l'autotrophie vis-à-vis du glucose et de l'O_2, fournissant ainsi une source intracellulaire de matières premières aux mitochondries.



Copiright © Pearson Education, inc., Publishing as Benjamin Cummings

Figure 3 : Bilan des processus de glycolyse, de respiration et de photosynthèse.
Lors de la glycolyse, la cellule produit 2 moles d'ATP et 1 mole de pyruvate par mole de glucose (A). La présence de mitochondries permet d'améliorer fortement ce rendement par l'utilisation du pyruvate libéré. En effet, ce dernier entre alors, par l'intermédiaire de l'acétyl-Coenzyme A, dans le cycle de Krebs (B) et permet la synthèse de 2 moles supplémentaires d'ATP. Le transport sous-jacent d'électrons aboutit (C), par phosphorylation oxydative, à la synthèse de 34 moles d'ATP additionnelles. Lors de la photosynthèse, la phase claire (D) permet la production d'ATP, de NADPH et d'O_2 par photolyse de l'eau. La phase sombre (E), quant à elle, indépendante de la phase claire, permet la fixation du CO_2 atmosphérique pour constituer de la matière organique sous forme de glucose par l'intermédiaire du cycle de Calvin.

Néanmoins, si l'O_2 représente une source d'énergie très efficace, la production d'espèces oxygénées réactives (EOR) est devenue une conséquence inaliénable de la vie en aérobie (Halliwell 2006). Ces molécules, constituées de radicaux libres, de molécules réactives et d'ions dérivés de l'O_2 sont très dommageables pour la cellule et proviennent

majoritairement des chaînes de transport d'électrons, du métabolisme des chloroplastes (Asada 2006) et des mitochondries (Adam-Vizi and Chinopoulos 2006; Navrot, Collin et al. 2006). En effet, au sein des chloroplastes, les centres réactionnels des photosystèmes catalysant la photolyse de l'eau sont une source importante de production d'EORs. Ces composés hautement réactifs sont produits lorsque l'intensité photonique reçue est supérieure à celle requise pour l'assimilation de carbone. C'est notamment le cas lors de modifications physiologiques et/ou environnementales. La chaîne de transport d'électrons est ainsi surchargée et conduit, par fuite des électrons, à la production d'EORs à partir de l'O_2 intracellulaire. Une autre facette de la production d'EORs concerne les mitochondries. La surcharge en électrons des complexes de la chaîne respiratoire a également pour conséquence leurs fuites. Ces électrons réagissent ainsi avec l'O_2 environnant et engendrent la formation d'EORs. De plus, la production d'eau à partir de l'O_2, dernière étape du transport d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, peut être incomplète et générer de ce fait des EORs supplémentaires. Un troisième compartiment dérivé du réticulum endoplasmique, le peroxysome, est également responsable d'une formation importante d'EORs par son intervention dans le métabolisme de photorespiration et d'oxydation des lipides (del Rio, Sandalio et al. 2006). La photorespiration est un ensemble de réactions biochimiques mises en œuvre par les organismes photosynthétiques à la suite de l'activité oxygénase de la ribulose-1,5-bisphophate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) impliquant les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes. Le phosphoglycolate, métabolite résultant de l'activité oxygénase de la RuBisCO au cours de la photorespiration, ne pouvant être directement métabolisé par le cycle de Calvin, est déphosphorylé au sein du chloroplaste en glycolate. Ce dernier, ainsi pris en charge par les peroxysomes, est converti en glycine dans une réaction produisant également de l'H_2O_2. Il est ainsi estimé qu'environ 2 % de la consommation d'O_2 des plantes conduisent à la formation d'EORs (Puntarulo, Sanchez et al. 1988). En revanche, chez les animaux, si la consommation d'O_2 par les mitochondires est reliée directement à la formation d'EORs, des augmentations ou des diminutions de production d'EORs ne sont pas forcément imputés à des variations de cette consommation (Barja 2007). A faibles concentrations, ces espèces hautement réactives ne sont pas toxiques pour les cellules mais présentent au contraire des fonctions essentielles dans de nombreux processus cellulaires tels que la croissance et le développement des plantes (Foreman, Demidchik et al. 2003; Pena-Ahumada, Kahmann et al. 2006; Bahin, Bailly et al. 2011), la signalisation cellulaire (Yan, Tsuichihara et al. 2007; Jannat, Uraji et al. 2011) et la réponse à différents stimuli exogènes et endogènes (Mullineaux and Karpinski 2002; Torres, Dangl et al. 2002; Miller, Shulaev et

al. 2008). Cependant, le métabolisme primaire n'est pas le seul à générer des EORs. De nombreux stress environnementaux, aussi bien biotiques qu'abiotiques, ont pour point commun une augmentation de la production des EORs (Figure 4) (Sharma and Dubey 2007; Krasensky and Jonak 2012; Ma, Zhang et al. 2012). A plus fortes concentrations, ces EORs deviennent très vite délétères et très dommageables pour la cellule en réagissant avec les composants cellulaires. Ils peuvent ainsi, par le biais d'oxydations non contrôlées, modifier les protéines, les acides nucléiques et les lipides et conduire de ce fait à la mort cellulaire (Halliwell 2006; Moller, Jensen et al. 2007). Les organismes ont donc développé des systèmes permettant de détecter et de répondre à ces molécules générant une situation de stress. Il s'agit essentiellement de molécules antioxydantes telles que le glutathion (GSH) et l'ascorbate (Asc) ou d'enzymes telles que les superoxyde dismutases (SOD), les catalases, les peroxydases et les glutathions S-transférases (GST) dont le but est de neutraliser directement les EORs ou d'intervenir indirectement dans la régulation du stress oxydant (Figure 4).

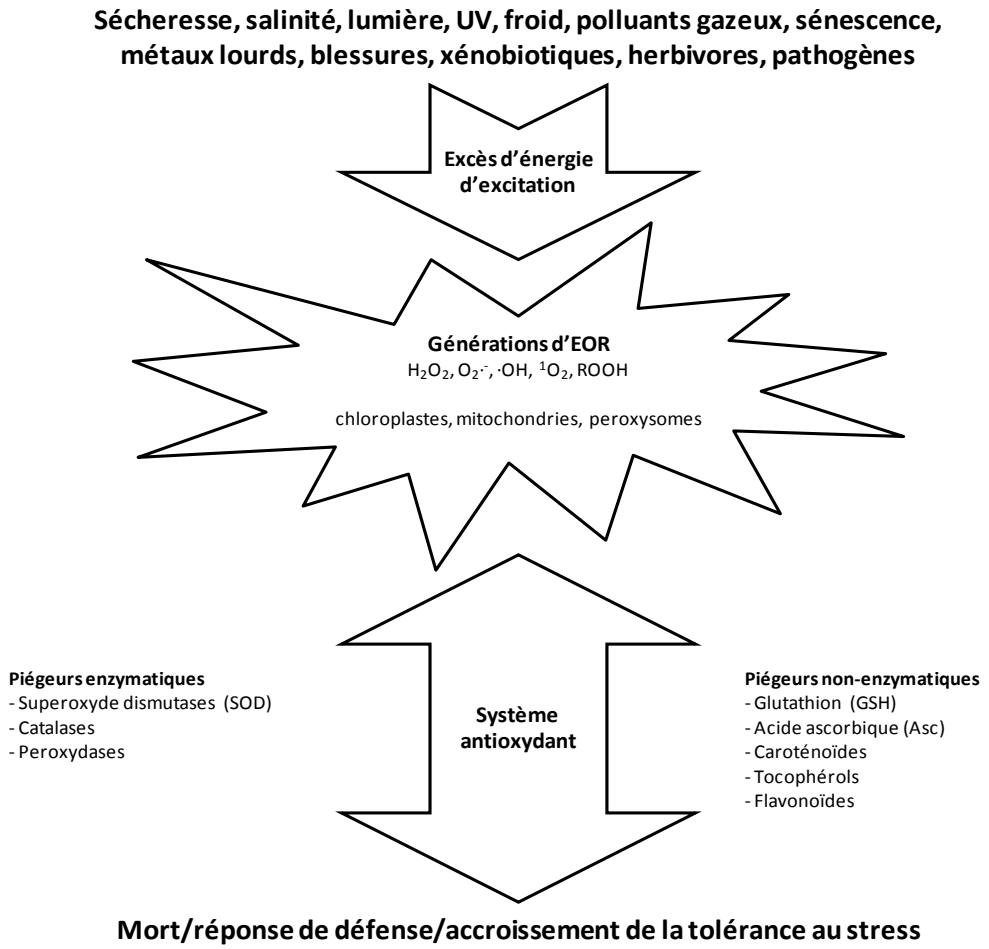
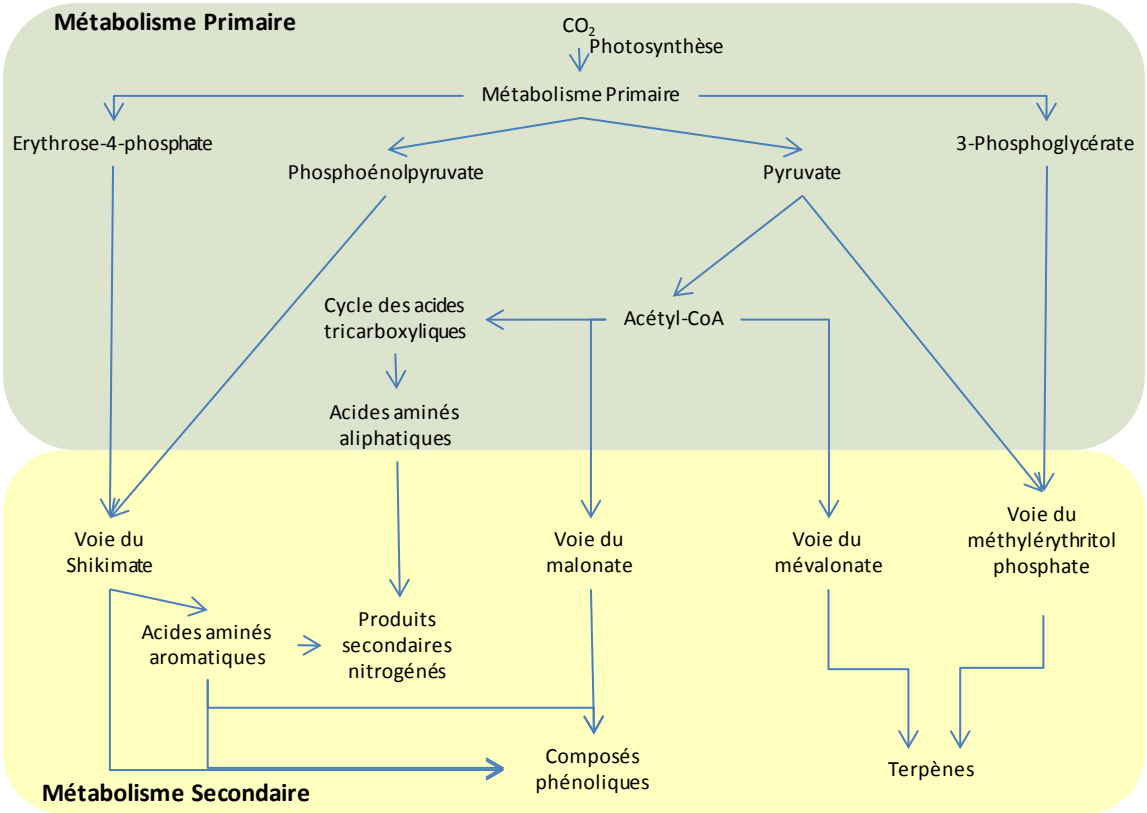


Figure 4 : Réponse des plantes à différents stress biotiques et abiotiques ((Latowski, Surówka et al. 2010)).

Le système antioxydant enzymatique et non-enzymatique permet aux plantes de réguler la quantité d'espèces oxygénées réactives (EOR) et de moduler la signalisation dépendante des EORs.

Parallèlement à ce risque oxydatif qu'induit la vie en aérobie, les processus de photosynthèse et de respiration ont également permis aux formes de vie de se diversifier et de se complexifier au cours de l'évolution. En effet, l'énergie et la matière organique disponibles sont devenues supérieures aux seuls besoins du métabolisme primaire. Ces excès ont ainsi pu être alloués à d'autres fonctions ou à d'autres voies de biosynthèse, notamment celles constituant le métabolisme secondaire (Figure 5). Le métabolisme secondaire, dont la distribution taxonomique est relativement restreinte, contribue à des fonctions cellulaires qui ne sont pas indispensables, contrairement au métabolisme primaire qui désigne un métabolisme à la fois universel et participant à des fonctions cellulaires essentielles de l'organisme (croissance, développement et reproduction). Les composés issus du métabolisme secondaire sont nommés métabolites secondaires et ne participent pas directement à la croissance, au développement ou à la reproduction de l'organisme. Bien qu'il soit, à l'heure actuelle, impossible de déterminer le nombre exact de métabolites secondaires existants, plusieurs milliers ont déjà été identifiés.



<u>Figure 5 :</u> Allocation au métabolisme secondaire des excès de carbone fixés par le métabolisme primaire.

Par l'intermédiaire de la photosynthèse, le CO_2 atmosphérique est fixé puis converti en glucides. Les excès de matière organique sont, par la suite, utilisés sous forme de dérivés glucidiques et alloués à différentes voies de biosynthèse constituant le métabolisme secondaire. Ces différentes voies permettent la production de composés, ou de métabolites secondaires très variés contribuant à des fonctions très diverses mais non-essentielles à la vie des plantes.

Néanmoins, certains métabolites secondaires dérivent du métabolisme primaire et/ou semblent indispensables à la croissance et à la survie de la plante. Par exemple, la chlorophylle et la lignine, considérées comme des métabolites secondaires, sont des molécules respectivement associées à la photosynthèse et à la rigidification des plantes terrestres. Les métabolites secondaires peuvent ainsi être synthétisés de manières constitutive et ubiquitaire. Cependant, ils sont le plus souvent spécifiques à certains tissus, organes, voire organelles, ou peuvent n'être produits que lors de stades de développement particuliers. Leur production peut également être induite par des conditions environnementales particulières. Quelle que soit leur site ou mode de production, les métabolites secondaires ayant une fonction primordiale conservée sont présents dans de nombreux organismes. En revanche, ceux possédant une fonction biologique précise sont la plupart du temps spécifiques à certains règnes biologiques, voire organismes. Cette haute spécificité suggère une forte implication de ces composés dans l'adaptation des organismes à leur environnement ou à leur niche écologique. En effet, le principal rôle des métabolites secondaires, au travers d'un rôle de défense, semble lié à l'environnement, qu'il s'agisse d'environnement intra- ou extracellulaire. Leurs fonctions sont ainsi très nombreuses et variées, allant d'un rôle de défense, d'attraction d'autres espèces, de communication au sein d'un individu ou d'une communauté, à un rôle structural, pour ne citer que quelques exemples. Toutes ces fonctions sont sans doute à mettre en relation avec leur grande diversité structurale. Au travers de leurs propriétés antioxydantes, certains métabolites secondaires permettent de faire face à la production excessive d'EORs. En effet, la forte pression exercée par les EORs a ainsi permis l'émergence de voies de biosynthèse de molécules capables de les neutraliser. Les métabolites secondaires sont ainsi devenus des acteurs majeurs de la lutte contre le stress oxydant. Il est en revanche difficile de considérer cette fonction antioxydante des métabolites secondaires comme fonction principale ou première. En effet, de nombreuses molécules ne possèdent pas cette fonction antioxydante et ont des rôles totalement différents de la détoxication cellulaire. Cependant, certaines voies de biosynthèse de composés non-antioxydants semblent dériver de voies de biosynthèse de composés antioxydants. Il est, de ce fait, fortement suggéré que le stress oxydant a largement contribué à la mise en place du métabolisme secondaire, notamment chez les plantes.

Si les organismes ont développé une capacité à produire de nombreux métabolites secondaires aux propriétés antioxydantes, ils ont également développé des systèmes enzymatiques capables de maintenir, de gérer et de réguler les EORs. Les glutathion

transférases, enzymes dites du métabolisme secondaire, sont notamment étudiées depuis plus de 40 ans pour leur implication dans la détoxication cellulaire. En effet, certaines présentent des activités de type peroxydase et sont capables de neutraliser directement les EORs ou de limiter les dommages engendrés par ces molécules réactives. Cependant, leurs principales fonctions concernent, au travers de la conjugaison d'une molécule de glutathion, la neutralisation de composés toxiques. Ces composés, qu'ils soient endogènes ou exogènes, appartiennent pour la plupart aux métabolites secondaires. Bien que cette fonction de détoxication des GSTs reste très étudiée, de plus en plus d'études mettent en avant l'implication de ces enzymes dans d'autres processus cellulaires liés au métabolisme secondaire. Pour ne citer que quelques exemples, il est ainsi clairement établi aujourd'hui que les GSTs sont des enzymes primordiales pour la modification, la biosynthèse ou le recyclage de métabolites secondaires. Par la diversité de substrats qu'elles semblent pouvoir accepter et les nombreuses réactions qu'elles peuvent catalyser, les GSTs sont devenues des enzymes indispensables du métabolisme secondaire des organismes.

Après une synthèse bibliographique des connaissances sur le domaine du stress oxydant et du métabolisme secondaire sous-jacent, les expériences menées et les résultats obtenus seront présentés sous forme d'articles scientifiques constituant la partie résultats de ce manuscrit puis enfin discutés tout en proposant quelques perspectives de recherche.

Les espèces oxygénées réactives chez les plantes

1. Les espèces réactives de l'oxygène

Les radicaux libres constituent un groupe d'entités chimiques, atomiques ou moléculaires, possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur une orbitale externe. Ces entités ne respectent donc pas la règle de l'octet qui définit que les atomes de numéro atomique supérieur à quatre tendent à se combiner afin de présenter huit électrons dans leur couche électronique externe. Cette combinaison aboutit à une structure électronique stable, comparable à celle des gaz nobles (éléments constituant la dernière colonne du tableau périodique des éléments). La présence d'électrons célibataires confère ainsi une grande instabilité moléculaire à ces entités qui sont alors capables de réagir avec de nombreux composés de façon aspécifique. Afin de se stabiliser, ces molécules ont tendance à récupérer des électrons d'autres molécules, contribuant ainsi à leur haute réactivité. Ces composés proviennent le plus fréquemment d'une rupture de liaison covalente entre deux atomes d'une molécule suite à l'apport d'énergie. Au lieu de former un anion et un cation par rupture hétérolytique, la rupture homolytique de la liaison distribue équitablement les électrons de la liaison sur chaque atome, produisant ainsi deux radicaux (Figure 6).

$$A\text{-}B \longrightarrow A^{+} + B^{-}$$

$$A\text{-}B \longrightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$$

Figure 6 : Rupture hétérolytique et homolytique d'une molécule.
La rupture hétérolytique d'une molécule A-B aboutit à la formation de deux espèces ioniques dont une capte les électrons de la liaison. En revanche, lors d'une rupture homolytique, les électrons de la liaison sont partagés équitablement entre les deux espèces induisant la formation de deux radicaux.

Ces composés se forment spontanément pendant le métabolisme cellulaire des chloroplastes (Asada 2006), des mitochondries (Lesser 2006), des peroxysomes (Corpas, Barroso et al. 2001) et du réticulum endoplasmique (Bernhardt 1996). Cependant, des processus cellulaires tels que la fermeture stomatique ou la réaction d'hypersensibilité lors d'attaques de pathogènes chez les plantes font intervenir une production d'espèces réactives. Elles participent alors à la signalisation cellulaire dans le premier cas par induction d'une sortie d'eau calcium-dépendante des cellules de garde, induisant une diminution du volume cellulaire (Bright, Desikan et al. 2006). La production d'EORs lors d'une infection par un

pathogène contrôle en revanche la non-prolifération du pathogène dans les tissus notamment par le renforcement de la paroi cellulaire et/ou par la mort, au niveau du site d'infection, de certaines cellules (Hammond-Kosack and Jones 1996). La production d'espèces réactives est également une conséquence du dérèglement du métabolisme cellulaire (Fulbert and Cals 1992). En effet, de nombreux stress biotiques et abiotiques ont pour point commun la génération d'EORs. Par exemple, les processus de photosynthèse chloroplastique et de respiration mitochondriale constituent des sources majeures de production de ces molécules (Adam-Vizi and Chinopoulos 2006; Asada 2006). Chez les plantes, lors d'altérations des conditions physiologiques par des stress tels que le manque d'eau, la surexposition à la lumière ou la chaleur, ces processus vont induire la production d'EORs par modifications des capacités photosynthétiques sous-jacentes à la chaîne de transport des électrons (Yordanov, Velikova et al. 1999; Shah and Paulsen 2003; Adam-Vizi and Chinopoulos 2006; Navrot, Collin et al. 2006). Les espèces dérivées de l'oxygène forment un groupe d'entités très réactives. En effet, si l'oxygène moléculaire O_2 est une molécule relativement stable, son activation le rend très dommageable, du fait de son instabilité, vis-à-vis des molécules organiques telles que les acides aminés, les lipides et les acides nucléiques (Cadenas 1989). Cette activation conduit à la formation de quatre EORs principales que sont l'oxygène singulet ($^1O_2$ ou •O-O•) provenant de l'excitation de la molécule de dioxygène triplet (forme habituelle de l'oxygène), l'anion superoxyde ($O_2•^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH•) (Figure 7).

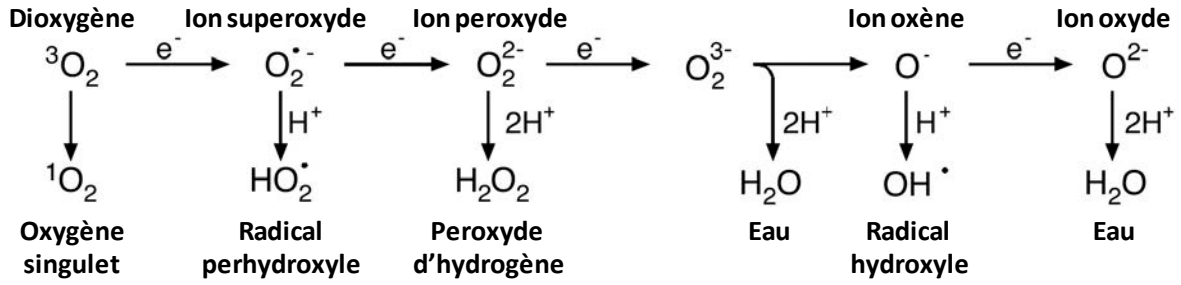


Figure 7 : Génération de différentes EORs (d'après (Apel and Hirt 2004)).
La génération des EORs a lieu par transfert d'énergie ou par réduction séquentielle univalente de l'oxygène triplet à l'état fondamental.

L'oxygène singulet se caractérise par une conformation électronique particulière hautement instable où deux électrons de spins opposés se trouvent sur une même orbitale moléculaire. L'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle sont, quant à eux, des intermédiaires de réduction de ce même oxygène triplet en eau (H_2O) (Apel and

Hirt 2004; Krieger-Liszkay 2005). Au sein du chloroplaste, l'énergie d'excitation conduisant à l'obtention de l'oxygène singulet peut provenir du transfert de l'énergie d'excitation de la chlorophylle du photosystème II (PSII) à l'oxygène moléculaire (Gorman and Rodgers 1992; Krieger-Liszkay 2005). En effet, lors d'une intensité photonique supérieure à la capacité photosynthétique du chloroplaste, la chaîne de transport d'électrons est saturée. Comme le PSII ne peut plus transmettre ces électrons à la plastoquinone (coenzyme de la famille des quinones participant au transfert des électrons entre le PSII et le complexe $Cytb_6/f$) pour diminuer son état d'excitation, il transfère alors son énergie à l'oxygène triplet pour que son électron d'excitation retombe sur une orbitale de plus basse énergie (Figure 8).

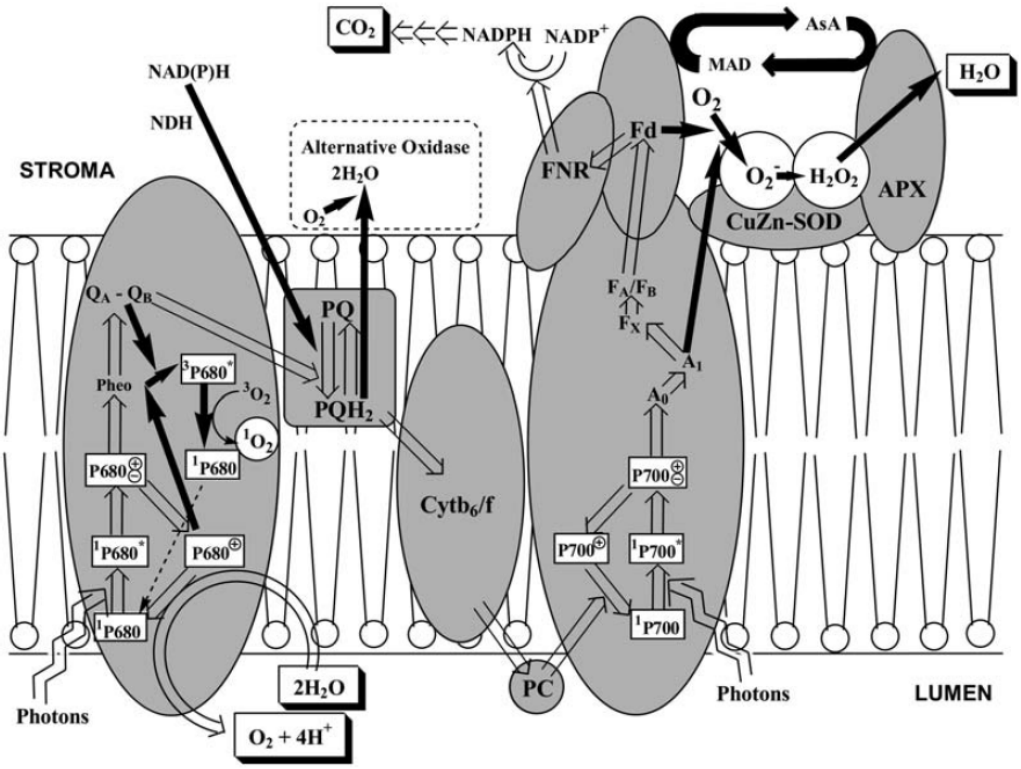


Figure 8 : Production de $^1O_2$ par le PSII et d'$O_2\bullet^-$ par le PSI dans la membrane des thylacoïdes ((Asada 2006)).

Lors de dysfonctionnements de la chaîne de transport des électrons chloroplastique par surcharge, la fuite des électrons conduit à la production d'EORs. Les flèches blanches indiquent le chemin des électrons lorsque ceux-ci sont tous utilisés pour l'assimilation du CO_2. Les flèches noires, en revanche, représentent le chemin des électrons lorsque la chaîne de transport des électrons est surchargée. Le flux d'électrons devient supérieur à la capacité réactionnelle de fixation du CO_2, provoquant une fuite des électrons vers l'O_2. Seuls les systèmes de capture des EORs thylacoïdales sont représentés. PQ, plastoquinone ; PQH2, plastoquinol ; Fd, ferrédoxine ; APX, ascorbate peroxydase ; SOD, superoxyde dismutase ; Cyt, cytochrome ; PC, plastocyanine ; FNR, ferrédoxine $NADP^+$ réductase.

Par cet excès d'énergie, l'oxygène triplet est converti en oxygène singulet (Asada 2006). Cette EOR hautement réactive peut alors oxyder la plupart des macromolécules

cellulaires telles que les protéines, les acides gras et l'ADN afin de diminuer son état d'excitation (Kasai 1997; Wagner, Przybyla et al. 2004; Krieger-Liszkay, Fufezan et al. 2008). L'anion superoxyde $O_2\bullet^-$, espèce monoradicale moins réactive que l'espèce biradicale $^1O_2$, est la première EOR formée lors de la réduction de l'O_2 en H_2O (Figure 9) (Halliwell 1977).

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2\bullet^-$$

$$O_2\bullet^- + e^- + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

$$H_2O_2 + e^- + H^+ \longrightarrow H_2O + HO\bullet$$

$$HO\bullet + e^- + H^+ \longrightarrow H_2O$$

Figure 9 : Etape de réduction de l'O_2 en H_2O.
Ensemble des réactions de production des EORs, ou impliquant des EORs, et permettant la réduction de l'O_2 en H_2O au sein de la chaîne respiratoire des mitochondries.

Des dysfonctionnements des chaînes de transport d'électrons peuvent également conduire à la formation d'EORs, notamment au niveau du complexe protéique I mitochondrial et du PSI chloroplastique. Le principal site de production des EORs dans la cellule provient en réalité de la mitochondrie. Le taux d'EORs produit est directement lié au taux de consommation d'O_2 et est proportionnel au nombre de mitochondries dans la cellule (Lesser 2006). Cette production, due à une fuite d'électrons, a lieu dans la membrane interne mitochondriale principalement au niveau des complexes I (NADH déshydrogénase) et III (complexe cytochrome bc1) même si le complexe II (succinate déshydrogénase) semble également impliqué. Au niveau du complexe I, lorsque le rapport NAD(P)H/NAD(P)+ est trop élevé, une fuite d'électron mène à la production d'$O_2\bullet^-$ (Adam-Vizi and Chinopoulos 2006). Lors de la photosynthèse, des fuites d'électrons au niveau du PSI peuvent aussi générer ces anions. L'anion superoxyde est capable d'oxyder différentes enzymes mais est surtout responsable de la formation des autres EORs. Il est ainsi le précurseur du radical hydroxyle OH• par l'intermédiaire des réactions d'Haber-Weiss et de Fenton (Figure 10).

$$O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2 \text{ (Réduction de l'anion superoxyde)}$$
$$H_2O_2 + M^{n+} \longrightarrow M^{(n+1)+} + HO^- + HO^{\bullet} \text{ (Réaction de Fenton)}$$
$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + HO^- + HO^{\bullet} \text{ (Réaction d'Haber-Weiss)}$$

Figure 10 : Réaction de Fenton et d'Haber-Weiss.
La réaction de Fenton nécessite un métal de transition (M), généralement le fer. Cette réaction aboutit à l'ion Fe^{3+}, permettant la réduction de l'anion superoxyde. La réaction d'Haber-Weiss correspond au bilan des deux réactions.

Ces réactions conduisent également à la formation d'$^1O_2$ bien que les niveaux produits restent faibles (environ 0.2 % de l'apport initial en $O_2\bullet^-$) (Khan and Kasha 1994; MacManus-Spencer and McNeill 2005). L'anion superoxyde peut aussi engendrer la formation d'H_2O_2 soit spontanément soit par catalyse au travers des superoxyde dismutases (Halliwell 2006). Ces enzymes permettent la dismutation d'$O_2\bullet^-$ en H_2O_2 et en oxygène à l'aide de cations métalliques (Fridovich 1986). Le peroxyde d'hydrogène est par la suite pris en charge par d'autres systèmes telles que les thiol-peroxydases, les catalases, l'ascorbate ou le glutathion au travers du cycle ascorbate-glutathion (Asada 1999). H_2O_2, quant à lui, est une EOR moins réactive que les précédentes (Halliwell 1977; Halliwell 2006). Chez les plantes, deux des sources principales de production de ce composé sont situées au niveau des chaînes de transport d'électrons des chloroplastes et des mitochondries. En effet, cette EOR est une des espèces intermédiaires produites au cours de la réduction de l'O_2 en H_2O par action des SODs sur l'anion $O_2\bullet^-$ (Fridovich 1986; Asada 1999; Braidot, Petrussa et al. 1999). Le peroxyde d'hydrogène est également formé au travers du processus de photorespiration chloroplastique et de l'oxydation des acides gras, notamment par le métabolisme peroxysomal (Stone and Yang 2006). La molécule d'H_2O_2 possède une double fonction suivant sa concentration intracellulaire. Elle est nécessaire à la cellule à faible concentration (0,001 à 0,5 µM) mais devient toxique à plus forte concentration. À une concentration inférieure à 0,5 µM c'est à dire ne dépassant pas le seuil de capacité de régulation de l'organisme, l'H_2O_2 est une EOR fortement impliquée dans les mécanismes de signalisation cellulaire. Elle est, en effet, considérée comme une molécule signal majeure participant à la reconnaissance et à la réponse à de nombreux stress, aussi bien biotiques qu'abiotiques (Stone and Yang 2006). En revanche, à des concentrations supérieures à 0,5 - 0,7 µM, sa réactivité en fait une molécule toxique pour les macromolécules biologiques contenant des acides aminés, des lipides ou des acides nucléiques (Stone and Yang 2006). Quant au radical hydroxyle OH•, il s'agit de la forme la plus réactive des EORs. Sa formation provient de la

conversion d'$O_2^{\bullet -}$ et d'H_2O_2 en présence d'un métal de transition, notamment le fer, par les réactions d'Haber-Weiss et de Fenton (Haber and Weiss 1932; Rigo, Stevanato et al. 1977). Sa forte réactivité lui permet d'interagir avec les principales molécules biologiques que sont les acides nucléiques, les lipides, les acides aminés et les sucres (Czapski 1984; Imlay and Linn 1988).

2. Conséquences principales des EORs sur la cellule et les systèmes cellulaires majeurs de neutralisation

Les EOR sont continuellement et indirectement produites par des processus cellulaires tels que la photosynthèse, la respiration et le métabolisme du réticulum endoplasmique et des peroxysomes (Bernhardt 1996; Corpas, Barroso et al. 2001; Asada 2006; del Rio, Sandalio et al. 2006; Navrot, Collin et al. 2006). Elles sont prises en charge rapidement par différents systèmes antioxydants, tels que le cycle ascorbate-glutathion et les SODs. Leurs effets toxiques sont minimisés voire éliminés (Fridovich 1986; Noctor and Foyer 1998). Cependant, en conditions de stress (notamment sécheresse, température, luminosité et attaque de pathogène), le taux d'EOR augmente fortement en raison d'une production accrue (Sharma and Dubey 2007; González-Pérez, Gutiérrez et al. 2011; Krasensky and Jonak 2012; Ma, Zhang et al. 2012). Les dysfonctionnements cellulaires engendrés par ces types de stress provoquent généralement une augmentation intracellulaire de la concentration en EORs. Ce stress oxydant va dès lors participer à la signalisation cellulaire notamment par l'activation de canaux calciques et de MAP-Kinases (del Rio, Sandalio et al. 2006; Hu, Neill et al. 2009; Miura and Tada 2014). Les EORs ont ainsi une fonction de messagers secondaires contribuant à la mise en place d'une réponse appropriée. En revanche, si la quantité d'EORs dépasse la capacité de régulation de la cellule, le stress oxydant n'est plus géré de façon adéquate et les EORs non prises en charge deviennent très dommageables. En effet, leurs fortes réactivités leur permettent d'interagir avec de nombreux composants biologiques. Les dommages ainsi causés aux protéines, acides gras et acides nucléiques pourraient s'avérer irrémédiables et engendrer la mort de la cellule, du tissu, voire de l'organisme (Moller, Jensen et al. 2007).

a. Les EORs et la signalisation cellulaire

La signalisation cellulaire induite par les EORs ou signalisation redox fait intervenir toutes les molécules réduites et oxydées de la cellule, aussi bien celles de faibles masses moléculaires que les macromolécules biologiques telles que les protéines et les lipides

membranaires. Le maintien d'un équilibre entre la production des EORs et leur détoxication est primordial afin d'éviter toutes réactions d'oxydation non-contrôlée et la génération de dommages irréversibles, comme la peroxydation en chaîne des lipides membranaires provoquant une rigidification des membranes (Noctor and Foyer 1998; Mittler, Vanderauwera et al. 2004; Gill and Tuteja 2010; Foyer and Noctor 2013). A concentrations physiologiques (concentrations inférieures au µM), les EORs ont un rôle de second messager. Par exemple, elles interviennent dans le gravitropisme, l'apoptose et l'acquisition de la tolérance vis-à-vis de nombreux stress biotiques et abiotiques (Bethke and Jones 2001; Joo, Bae et al. 2001; Torres, Dangl et al. 2002; Miller, Shulaev et al. 2008). Les EORs, notamment H_2O_2, sont en effet considérés comme les molécules signal de la reconnaissance et de la réponse à de nombreux stress au travers de leur production accrue dans ces conditions (Neill, Desikan et al. 2002; Hung and Kao 2007). Elles sont présentes au sein de cascades de signalisation, notamment celles conduisant à la régulation des canaux potassiques. Cet arrêt du flux de potassium entrant entraîne l'alcalinisation du milieu cellulaire et indirectement l'ouverture de canaux permettant l'entrée d'ions Ca^{2+} ayant un rôle de second messager (Zhang, Dong et al. 2001; Bright, Desikan et al. 2006). H_2O_2 permet également l'oxydation ou, indirectement, la phosphorylation de certaines kinases, tels que les MAP-Kinases. La régulation de ces protéines de signalisation est notamment impliquée dans la tolérance à différents stress mais aussi dans la mort cellulaire (Figure 11) (Kovtun, Chiu et al. 2000; Ren, Yang et al. 2002). Enfin, cette EOR est responsable d'altérations de 1 à 2 % du transcriptome chez Arabidopsis (Desikan, S et al. 2001). La surexpression de gènes impliqués dans des mécanismes de détoxication cellulaire est proposée comme mécanisme de tolérance à différents stress. Cette participation des EORs est responsable de la tolérance aux variations osmotiques, de température et de disponibilité en eau chez Arabidopsis. Elle fut également mise en évidence lors de stress abiotiques chez la tomate au travers de l'acquisition d'une résistance de la plante à un stress généré par une blessure ou par une forte concentration saline (Orozco-Cardenas, Narvaez-Vasquez et al. 2001; Gemes, Poor et al. 2011). De plus, il semble que cette molécule soit capable de moduler l'expression de gènes au travers de la modification de facteurs de transcription (Delaunay, Isnard et al. 2000).

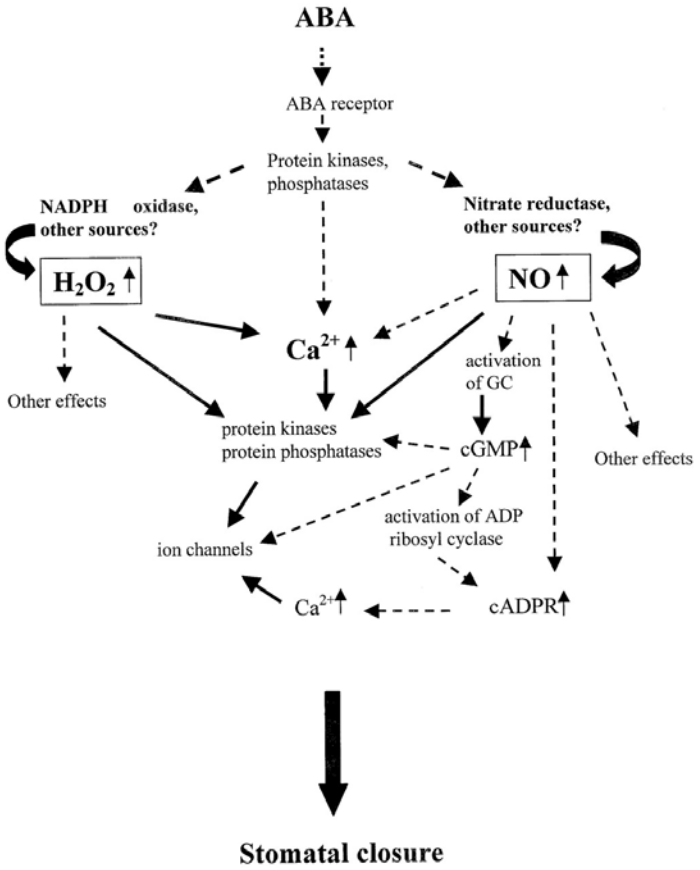
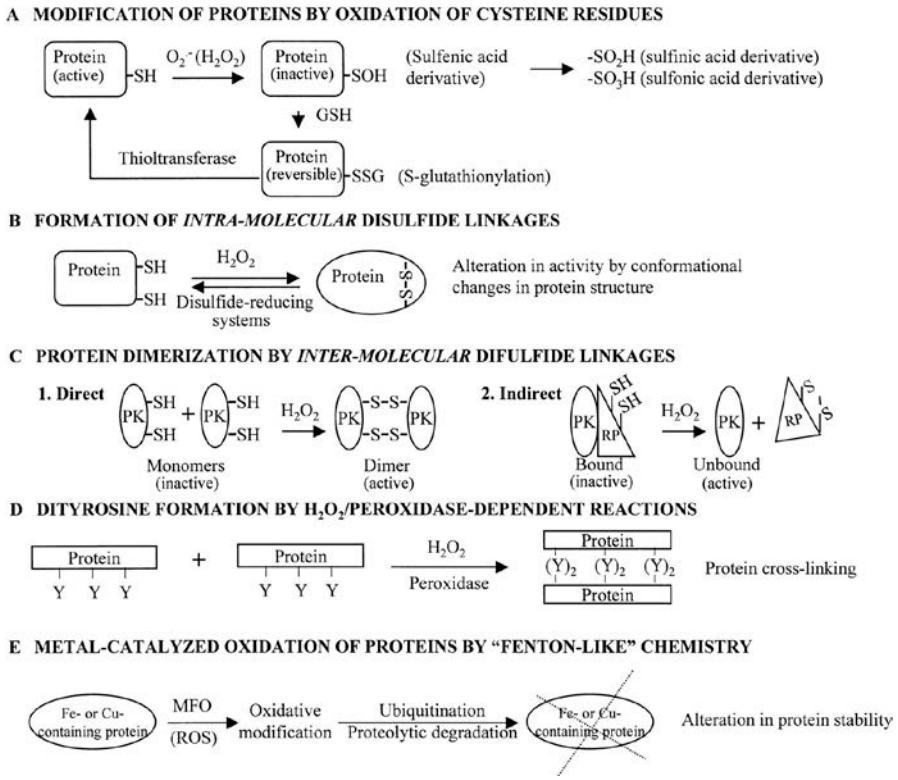


Figure 11 : Représentation schématique de la signalisation cellulaire induite par l'acide absicissique lors de la fermeture stomatique ((Desikan, Cheung et al. 2004)).
L'acide absissique (ABA) permet la fermeture des stomates au travers de voies de signalisation dépendantes d'espèces réactives de l'oxygène, notamment H_2O_2. La surproduction de cette EOR conduit à une signalisation calcium-dépendante qui aboutit à la fermeture des stomates par efflux d'eau. Cette signalisation se met notamment en place lors de stress tels que l'agression par un pathogène, un déficit en eau ou une température trop élevée. Les flèches pleines correspondent à des étapes mises en évidence expérimentalement et les flèches en pointillées à des voies de signalisation supposées.

b. L'oxydation des protéines

De nombreuses protéines sont susceptibles d'être oxydées par les EORs (Moller, Jensen et al. 2007). Les protéines chloroplastiques et mitochondriales essentielles à la synthèse d'énergie et de matière organique sont relativement exposées à l'oxydation par les EORs. En effet, la RuBisCO, protéine chloroplastique nécessaire à la fixation du CO_2, la NADH déshydrogénase et l'ATP synthétase, appartenant respectivement aux complexes I et V de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, peuvent être rapidement affectées par l'altération de leurs activités (Sweetlove, Heazlewood et al. 2002; Taylor, Day et al. 2004; Nakano, Ishida et al. 2006). Les enzymes du cycle de Calvin peuvent également subir des modifications conduisant à l'arrêt de ce cycle et donc à l'arrêt de la synthèse de dérivés du glucose (Kristensen, Askerlund et al. 2004; Moller and Kristensen 2006). Les modifications

engendrées par la réactivité des EORs vont essentiellement concerner les propriétés physiques des protéines. Il peut s'agir d'altérations d'acides aminés, tels que la nitrosylation et la formation de ponts disulfure, ou d'altérations plus conséquentes comme la fragmentation des protéines en peptides ou la modification de leurs charges électriques pouvant conduire à leur dénaturation et/ou à leur protéolyse (Figure 12) (Moller, Jensen et al. 2007).



<u>Figure 12 :</u> Modifications oxydatives majeures des protéines par les EORs telles que H_2O_2 ((Thannickal and Fanburg 2000)).

A : Le groupement thiol (-SH) des cystéines peut être mofidiés par $O_2^{\bullet-}$ (ou H_2O_2) pour former différents dérivés oxidés. La glutathionylation des cystéines permet de rétablir le groupement thiol au travers de l'action de certaines thiol-transférases. B : La formation d'un pont disulfure intramoléculaire peut altérer l'activité des protéines par des changements conformationnels de leurs structures. Ces ponts disulfures peuvent être réduits par des thiol-transférases telles que les thiorédoxines. C : La formation de ponts disulfures intermoléculaires peuvent être responsable de la dimérisation des protéines. De tels mécanismes pour l'activation de protéines kinases (PK) peuvent inclure leurs propre homodimérisations ou celles de protéines régulatrices (RP), conduisant à leurs dissociations du complexe inactif. D : La réticulation de protéines peut être induite par H_2O_2 ou catalysée par des peroxydases au travers de la formation de liaisons dityrosine. E : Les protéines contenant des métaux de transition peuvent être la cible d'oxydations dirigées, catalysées par le métal, par les EORs produites par certaines oxydases (MFO), conduisant ces protéines à leurs ubiquitination et leurs dégradations par des proétases.

Au sein des protéines, les acides aminés soufrés (cystéines et les méthionines), ainsi que certains cofacteurs, centres Fe/S et hèmes, constituent également des cibles privilégiés des EORs (Moller, Jensen et al. 2007). Si certaines altérations comme l'oxydation des acides aminés soufrés peuvent être corrigées, d'autres sont en revanche irréversibles. Les centres

fer-soufre oxydés par $O_2\bullet^-$, par exemple, ne sont, jusqu'à preuve du contraire, pas réparables et conduisent irrémédiablement à l'inactivation des enzymes (Ghezzi and Bonetto 2003; Imlay 2003).

c. La modification des lipides par les EORs et conséquences sur l'intégrité membranaire

Les lipides constituent également une cible de choix des EORs au travers de leur oxydation. Parmi les différents lipides présent dans la cellule, les plus sévèrement atteints sont les phospholipides. En effet, la liaison ester entre le glycérol et les acides gras constitue un très bon site d'attaque des EORs. De plus, la présence de doubles liaisons carbone-carbone sur les chaînes aliphatiques des phospholipides insaturés permet la déshydrogénation d'un carbone saturé voisin par l'attaque d'un radical tel qu'OH•. Le radical lipidique produit interagit avec une molécule d'O_2 pour former un radical peroxyle puis un hydroperoxyde après hydrogénation. L'oxygène singulet, par sa chimie biradicalaire, est en outre beaucoup plus réactif que l'O_2 (Rawls and van Santen 1970; Gill and Tuteja 2010). *In vivo*, les phospholipides insaturés représentent la composante principale des membranes biologiques par leur juxtaposition. Il est courant que la dernière étape d'hydrogénation se produise par arrachage d'un atome d'hydrogène au phospholipide voisin, formant un nouveau radical peroxyle puis hydroperoxyde. L'oxydation des phospholipides de proche en proche constitue la réaction en chaîne de peroxydation lipidique (Figure 13). Cette réaction, si elle n'est pas stoppée, se traduit par une perte d'intégrité des membranes biologiques très dommageable pour la cellule (Moller, Jensen et al. 2007). Cette perte affecte notamment la fluidité des membranes. Le fonctionnement des membranes est ainsi altéré du fait d'une diminution des mouvements des lipides et des protéines au sein de la bicouche lipidique.

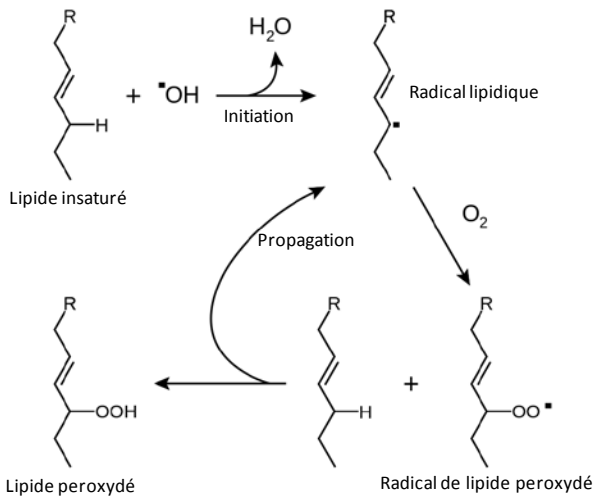


Figure 13 : Peroxydation lipidique en chaîne.
L'attaque d'un lipide membranaire par le radical hydroxyle aboutit à la formation d'un radical lipidique. Ce dernier, interagissant avec l'O_2 environnant, conduit à la production d'un radical lipidique peroxydé. Au sein des membranes cellulaires, ce radical peut arracher un proton à un lipide voisin. Un hydroperoxyde lipidique est ainsi formé mais la production concomitante d'un nouveau radical lipidique entraine la propagation de l'oxydation sur un autre lipide. Cette réaction en chaîne peut ainsi se propager à de nombreux lipides environnants.

Les diffusions passives et actives sont également ralenties et la régénération des composantes membranaires est plus difficile à cause de l'augmentation de l'imperméabilité des membranes (Yuli, Wilbrandt et al. 1981; Diz-Munoz, Fletcher et al. 2013). De plus, la mobilité des cellules et leur capacité d'endo- et d'exocytoses sont amoindries (Raucher and Sheetz 2000; Apodaca 2002). La peroxydation lipidique des membranes peut également engendrer la formation de malondialdehyde ou aldéhyde malonique, une autre espèce hautement réactive se manifestant lors du stress oxydant (Pryor and Stanley 1975). Cette molécule peut se fixer sur l'ADN et les protéines membranaires, induisant respectivement des mutations et une dégradation des protéines (Marnett 1999; Agarwal 2007; Moller, Jensen et al. 2007).

d. L'altération des acides nucléiques

Les acides nucléiques constituent la troisième cible importante des EORs. L'ADN nucléaire, chloroplastique et/ou mitochondrial peut subir des modifications plus ou moins importantes, réparables ou destructives. Les zones d'altération de l'ADN sont principalement aléatoires et observées pour de nombreux gènes. Aucune portion d'ADN ne semble plus concernée qu'une autre par l'attaque des EORs. Parmi les EORs décrites précédemment, le

radical hydroxyle OH• est le plus dommageable (Moller, Jensen et al. 2007). L'ADN est modifié par des mutations et/ou délétions d'acides nucléiques (Figure 14).

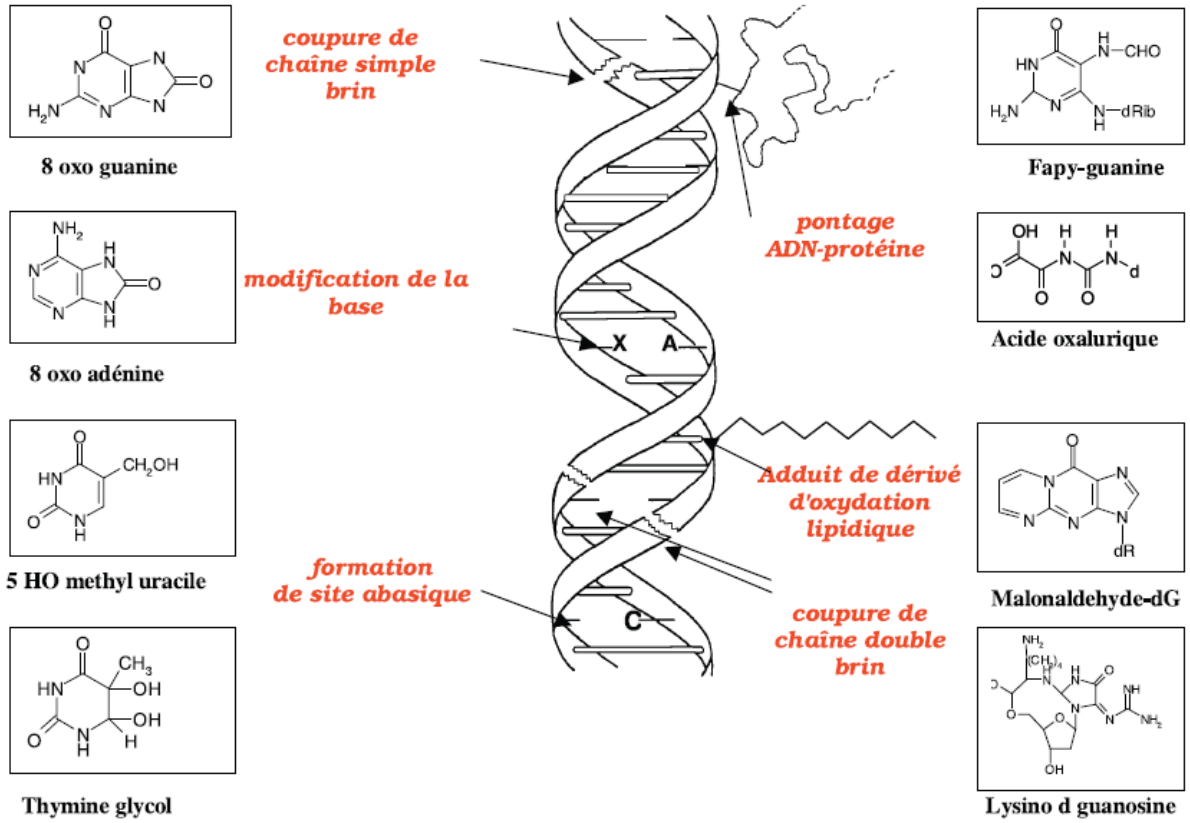


Figure 14 : Principaux dommages de l'ADN formés par des attaques radicalaires ((Favier 2003)).

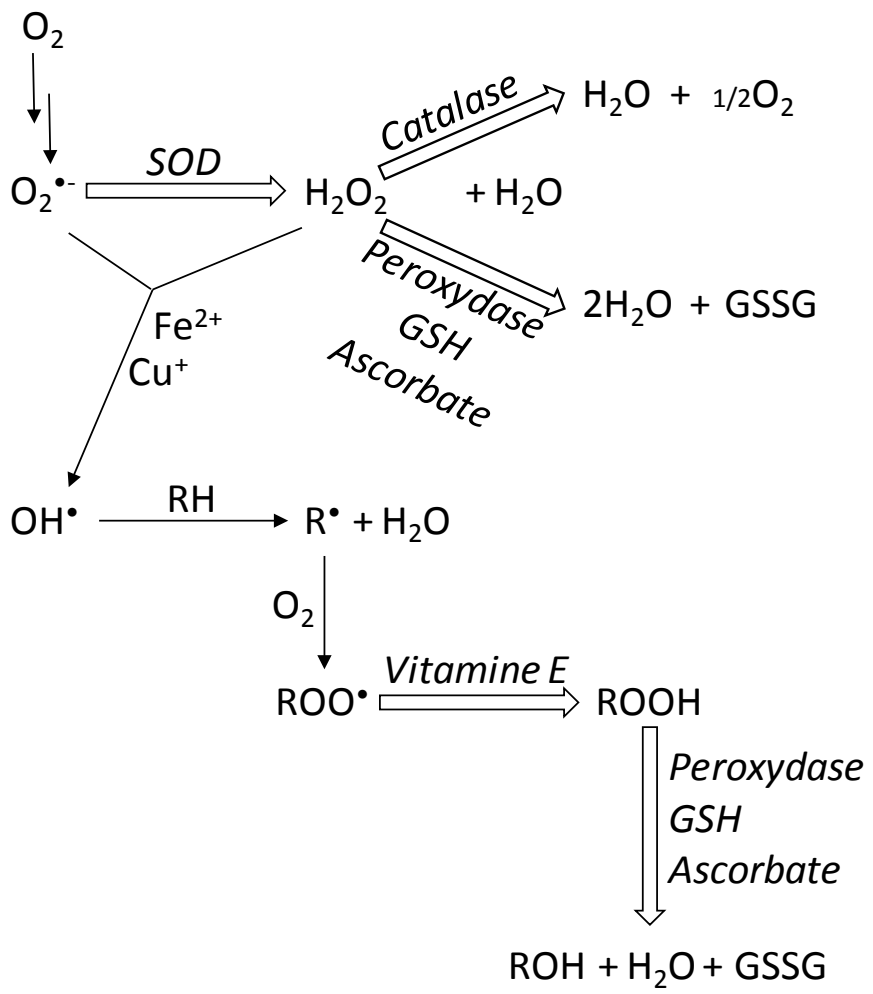
Les premières bases atteintes lors d'oxydation de l'ADN sont les thymines et les cytosines. Cependant, l'oxydation de ces bases induit généralement, par transfert de l'état oxydé, l'oxydation d'une guanine ou d'une adénine voisine, formant respectivement les bases 8-OxoGua et 8-OxoAde, produits majeurs de l'oxydation de l'ADN. De plus, il est estimé que la formation de 10 % des 8-OxoGua est accompagnée par la modification du résidu adjacent en résidu formylamine. En effet, la présence transitoire d'un adduit peroxyde entre la guanine et la base pyrimidine adjacente conduit, après réarrangement, à une mutation dite en tandem où les deux bases adjacentes sont oxydées (Bergeron, Auvre et al. 2010). Cette mutation peut être excisée du désoxyribose par une ADN glycosylase. Une endonucléase spécifique des sites apuriniques (AP-endonucléase), une ADN polymérase, puis une ADN ligase, permettent ensuite de restituer la base manquante par complémentarité de l'autre brin d'ADN. Cependant, la présence de mutations en tandem diminue de presque 50 % l'activité d'excision de l'ADN glycosylase (Bergeron, Auvre et al. 2010). L'ADN peut également subir des modifications plus dommageables telles qu'une suroxydation des riboses ou une cassure

simple ou double brin (Figure 14). Ces modifications peuvent toutefois être réparées par différents processus de réparation de l'ADN (Imlay and Linn 1988; Tuteja, Singh et al. 2001). Enfin, l'oxydation des histones, protéines de compaction de l'ADN, induit la formation de liaisons thymidine-tyrosine responsables d'un enroulement anormal de l'ADN sur ces dernières. Ces liaisons ont des effets négatifs sur la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN (Oleinick, Chiu et al. 1987). De tels changements du matériel génétique, s'ils ne sont pas réparés, conduisent irrémédiablement à des dysfonctionnements cellulaires, voire à des pertes totales de fonction pouvant conduire à la mort cellulaire (Halliwell 2006).

3. Stratégie de contrôle des EORs par la cellule

Les organismes ont développé différents mécanismes très efficaces afin de réguler finement l'homéostasie cellulaire des EORs, pour que leurs effets toxiques ne prédominent pas. Cette régulation permet ainsi à la cellule de tolérer ces composés tout en minimisant les dommages engendrés lors de leur présence à plus fortes concentrations dans les processus de signalisation cellulaire (Asada 1999; Mittler, Vanderauwera et al. 2004; del Rio, Sandalio et al. 2006; Moller, Jensen et al. 2007). La prise en charge des EORs est assurée par différents systèmes antioxydants constitués de molécules de faibles masses molaires et/ou d'enzymes capables de les neutraliser (Figure 15). Dans la suite de cette synthèse bibliographique, seront abordés le rôle primordial des principales molécules et enzymes antioxydantes mais également l'implication du métabolisme secondaire dans la synthèse de composés antioxydants. Parmi ces molécules, le glutathion et l'ascorbate constituent les deux principaux antioxydants cellulaires, tant au niveau de leur concentration et de leur pouvoir réducteur que de leur facilité à céder un électron. Les plantes ont également développé de nombreux métabolites secondaires capables de piéger les EORs. Les caroténoïdes et les flavonoïdes sont, par exemple, de très bons antioxydants de par leur nature phénolique et par la présence de chaînes carbonées polyinsaturées. Au niveau enzymatique, les SODs constituent la première défense conte les effets toxiques de niveaux élevés en anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène est, quant à lui, pris en charge principalement par les catalases et les peroxydases. Néanmoins, il existe d'autres composantes cellulaires capables de détoxiquer les EORs et/ou de limiter, voire réparer les dommages engendrés. Les hydroperoxydes d'acides gras peuvent être par exemple pris en charge dans le cytosol par des GSTs (Zhao, Singhal et al. 1999). Certaines de ces enzymes sont également capables de régénérer l'ascorbate. Néanmoins, l'activité des GSTs ne se limite pas à la régulation des EORs. Ces protéines sont, en effet, fortement impliquées dans les processus de détoxication

cellulaire des substances exogènes et dans le métabolisme secondaire. Ces propriétés seront abordées dans la dernière partie de cette synthèse bibliographique.



<u>Figure 15 :</u> Exemples de molécules, enzymatiques ou non, qui interviennent dans la détoxication cellulaire des EORs.

Les flèches pleines correspondent à des réactions productrices d'EORs alors que les fleches vides représentent des systémes de détoxication des EORs. SOD, superoxyde dismutase ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé ; R, chaîne carbonnée.

Principales molécules antioxydantes et systèmes enzymatiques de détoxication des EORs

Les organismes photosynthétiques, notamment les plantes terrestres, ont développé une forte capacité de régulation des EORs. Cette adaptation, conséquence de leur immobilité et des contraintes environnementales, se traduit par un réseau performant d'enzymes antioxydantes mais également par la production accrue de composés diversifiés issus du métabolisme secondaire. De nombreux métabolites secondaires (ou produits naturels) présentent en effet des propriétés protectrices vis-à-vis des EORs. Parmi eux, certaines classes de composés présentent de fortes propriétés antioxydantes.

1. Glutathion et ascorbate : molécules majeures du contrôle redox de l'environnement cellulaire

a. Le glutathion

Le glutathion constitue la molécule à thiol libre la plus répandue dans les cellules (Dickinson and Forman 2002). Ce tripeptide soluble, de formule γ-Glu-Cys-Gly, est omniprésent dans les cellules végétales et animales à des concentrations pouvant dépasser le millimolaire (Wu, Fang et al. 2004). Elle peut par exemple atteindre 5 mM dans les chloroplastes (Noctor, Arisi et al. 1998). Il est présent principalement sous deux formes redox distinctes, une forme réduite monomérique (GSH) et une forme oxydée dimérique (GSSG), toutes deux solubles en milieu aqueux (Figure 16).

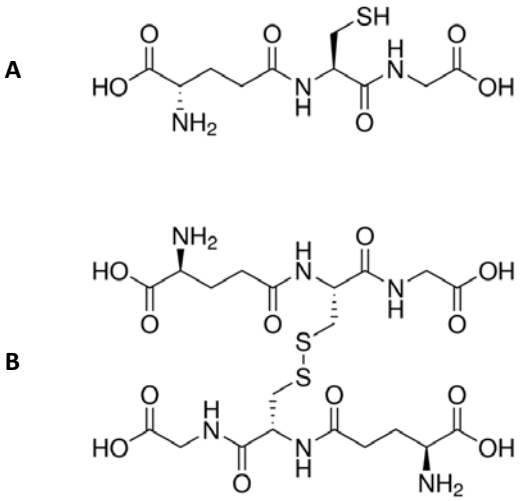


Figure 16 : Formules développées du glutathion réduit (A) et du glutathion oxydé (B).

Le glutathion sous forme réduite représente 98 à 99 % du glutathion cellulaire et se localise majoritairement (85 à 90 %) dans le cytosol (Lu 2000). Le GSH est issu d'une synthèse enzymatique en deux étapes ATP-dépendantes (Figure 17). Chez les plantes, la première étape de synthèse a lieu dans le chloroplaste alors que chez les animaux cette étape est cytosolique. Au cours de cette première réaction, une molécule de L-glutamate est condensée, par sa fonction carboxylique en position gamma (γ), à une molécule de L-cystéine. Cette synthèse est assurée par la γ-glutamyl-cystéine synthétase, contrôlée négativement le GSH (Noctor, Arisi et al. 1998; Dickinson and Forman 2002; Foyer and Noctor 2005). L'addition de la cystéine en position gamma de l'acide glutamique entraine la formation d'une liaison pseudo-peptidique entre ces deux acides aminés. De ce fait, le glutathion est considéré comme un pseudo-peptide. Lors de la seconde étape, qui a lieu dans le cytosol chez les animaux et dans les chloroplastes ou le cytosol chez les plantes, la molécule de L-γ-glutamylcystéine issue de la première étape de biosynthèse est condensée à une molécule de glycine par la glutathion synthétase, formant la molécule de glutathion réduit de formule γ-Glu-Cys-Gly (Figure 17) (Noctor, Arisi et al. 1998; Dickinson and Forman 2002; Foyer and Noctor 2005).

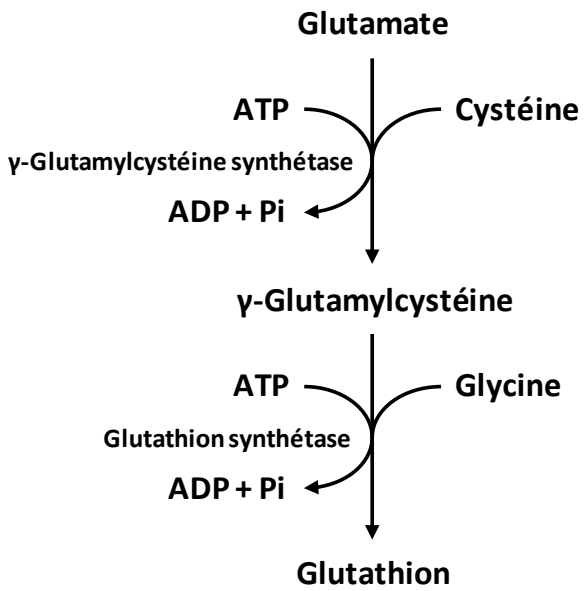


Figure 17 : Voie de biosynthèse du glutathion.
Le glutathion (ou γ-L-Glutamyl-L-cystéinylglycine) est un tripeptide formé par la condensation, en deux étapes, d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Dans une première étape, le glutamate est condensé à la cystéine par la γ-Glutamylcystéine synthétase puis le produit de la réaction (γ-glutamylcystéine) est condensé à la glycine par la glutathion synthétase pour donner du glutathion sous forme réduite. Ces deux étapes sont consommatrices d'énergie et nécessitent l'hydrolyse d'ATP.

Le GSH peut ensuite traverser les membranes biologiques à l'aide de transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) tels que les pompes à glutathion pour rejoindre les différents compartiments cellulaires. La forme oxydée du glutathion correspond à deux molécules de GSH reliées entre elles par un pont disulfure formé entre les groupements thiols des cystéines de chaque molécule. *In vivo*, la forme réduite, primordiale pour la cellule, est maintenue majoritaire par réduction de la forme oxydée par la glutathion réductase (GR), une flavoprotéine NADPH-dépendante. Cependant, lors de différents processus cellulaires, le GSH n'est pas toujours régénéré et une grande partie doit être synthétisée *de novo* (Dickinson and Forman 2002). Le thiol libre porté par la cystéine du GSH est un très bon donneur d'électrons à fort pouvoir réducteur (Pocsi, Prade et al. 2004). Cette forte nucléophilie a fait du glutathion un substrat indispensable pour de nombreuses réactions d'oxydoréduction. Il joue en effet un rôle majeur de tampon redox permettant de maintenir de nombreuses molécules à l'état réduit et donc l'état d'oxydoréduction de la cellule. Il intervient ainsi directement dans la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques et d'acides gras. Le GSH constitue également une source importante de stockage de soufre dans les différents compartiments cellulaires et tissus (Herschbach and Rennenberg 1991; Lappartient and Touraine 1996). Outre ces rôles, le glutathion intervient également dans la synthèse des protéines et des acides nucléiques, la régulation du cycle cellulaire, le transport cellulaire, le métabolisme secondaire, la protection cellulaire et l'activité de certaines enzymes agissant en tant que co-substrat (Gyuris, Golemis et al. 1993; Dickinson and Forman 2002; Penninckx 2002; Rouhier, Lemaire et al. 2008).

Pour donner quelques exemples, le glutathion peut non seulement neutraliser directement les EORs, mais aussi servir de donneur d'électrons à différentes réductases à thiol telles que les glutathion peroxydases (Gpx) et les GSTs (Brigelius-Flohe 1999; Yang, Cheng et al. 2001). Il permet également la régénération de l'ascorbate, molécule intervenant notamment dans la neutralisation d'H_2O_2 (voir ci-après), par l'intermédiaire des ascorbate peroxydases (Noctor and Foyer 1998). Par sa nature flexible et nucléophile, le glutathion peut également interagir avec une grande variété de molécules formant ainsi des composés conjugués dits glutathionylés (Evans and Baillie 2005). La glutathionylation de molécules intervient notamment dans le métabolisme et la dégradation de molécules endogènes et exogènes toxiques. Si cette réaction peut être spontanée, elle est surtout catalysée dans la majorité des cas par les GSTs (voir le paragraphe concernant les GSTs) (Hayes, Flanagan et al. 2005). Ce processus de conjugaison du glutathion peut cependant être utilisé dans

différents processus cellulaires. Au niveau des protéines, la glutathionylation réversible des cystéines qui pourrait se produire majoritairement par réaction du GSH avec des acides sulféniques, permettrait de réguler leur activité, et/ou de protéger ces dernières de l'oxydation (Shelton, Chock et al. 2005; Townsend 2007). En termes de régulation, il est communément admis que la glutathionylation de protéines est centrale notamment pour la signalisation redox en réponse aux EORs. La glutathionylation transitoire de molécules peut être également une étape nécessaire à la biosynthèse de certains composés tels que les leucotriènes et les prostaglandines (Wang and Ballatori 1998; Funk 2001; Lam and Austen 2002; Murphy and Zarini 2002). Enfin, le GSH constitue la matrice unitaire de la synthèse des phytochélatines. Ces molécules, après condensation de plusieurs molécules de glutathion, permettent la détoxication des éléments traces métalliques par séquestration vacuolaire et/ou excrétion (Grill, Loffler et al. 1989; Pawlik-Skowronska, Pirszel et al. 2007). En conclusion, le glutathion est fortement impliqué dans le métabolisme cellulaire bien que tous les processus auxquels il contribue ne soient pas encore totalement élucidés à l'heure actuelle. De nombreuses études ont montré que des changements de concentration en glutathion ou des variations des rapports GSH/GSSG se produisent lors de stress très variés, notamment lors d'accumulation d'EORs (May, Vernoux et al. 1998; Noctor, Arisi et al. 1998) (Potters, De Gara et al. 2002). Le glutathion revêt donc une importance primordiale pour la cellule. Néanmoins, d'autres molécules ayant des fonctions antioxydantes sont retrouvées dans la cellule, notamment chez les plantes.

b. L'ascorbate ou vitamine C

L'ascorbate (Asc) (L-*threo*-hex-2-enono-1,4-lactone), ou vitamine C, est une molécule, soluble dans l'eau, dérivée d'hexoses, synthétisée par toutes les plantes et tous les animaux à l'exception de quelques espèces telles que l'Homme, les singes et le cochon d'inde (Figure 18) (Burns 1957).

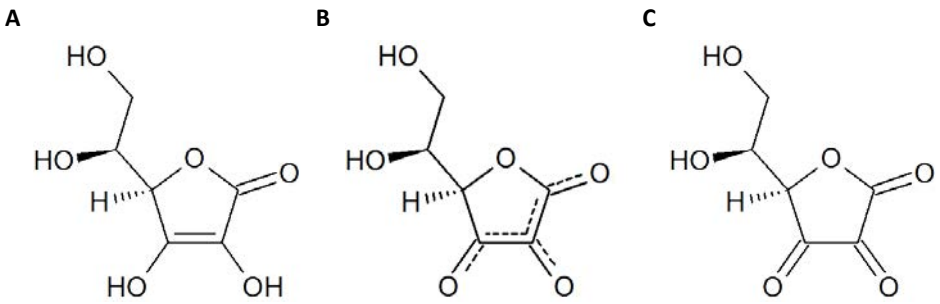
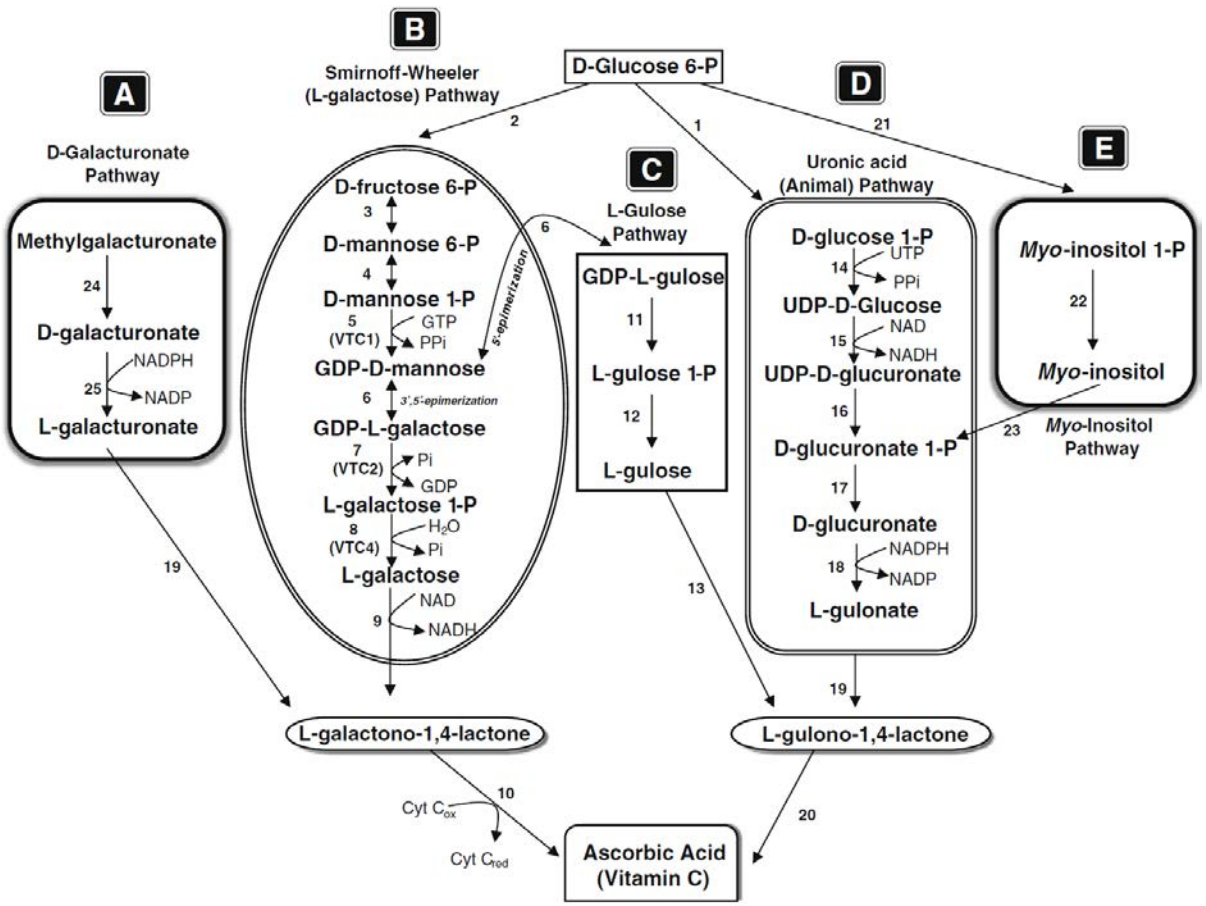


Figure 18 : La molécule d'acide ascorbique.
L'ascorbate agit comme un antioxydant puissant lorsqu'il est sous sa forme réduite (A) car la double liaison carbone-carbone lui permet de libérer jusqu'à 2 H^+ et 2 e^-. Lorsqu'il exerce sa fonction de réducteur, il est oxydé en déshydroascorbate (C), en passant par une forme intermédiaire de semi-déshydroascorbate (B) qui peut agir en tant que donneur ou accepteur d'électron.

En effet, une mutation dans la séquence codant une des enzymes de synthèse de l'Asc a conduit, au cours de l'évolution, à rendre cette protéine non-fonctionnelle chez l'Homme et plus largement chez les primates (Chatterjee 1973). L'Asc est présent dans la majorité des cellules végétales et des organelles mais également dans l'apoplaste, aussi bien dans les tissus photosynthétiques que non-photosynthétiques (Rautenkranz, Li et al. 1994; Noctor and Foyer 1998; Smirnoff and Wheeler 2000). Sa concentration, pouvant varier de 20 à 300 mM dans les chloroplastes, fait de l'ascorbate une des molécules les plus importantes pour les végétaux (Foyer, Rowell et al. 1983). Par exemple, dans les feuilles, il représente plus de 10% des hydrates de carbone solubles et se retrouve souvent en plus grande quantité que la chlorophylle (Noctor and Foyer 1998). La biosynthèse de l'ascorbate se situe dans le cytosol, excepté la dernière étape qui est localisée au niveau de la membrane interne des mitochondries chez les plantes et du réticulum endoplasmique chez les animaux (Smirnoff and Wheeler 2000; Linster and Van Schaftingen 2006). Il a longtemps été admis qu'une seule voie métabolique était responsable de la biosynthèse de l'ascorbate à partir de glucose. Cette voie était alors caractérisée par l'inversion des positions de deux carbones entre la structure du glucose (substrat initial) et celle de l'ascorbate (produit final), le carbone 1 du glucose devenant le carbone 6 de l'ascorbate, et inversement (Smirnoff and Wheeler 2000). Cependant, cette particularité qui n'est pas retrouvée chez les plantes a conduit à reconsidérer cette voie unique. Une seconde voie de biosynthèse de l'ascorbate a donc été mise en évidence plus tardivement chez les plantes. Ces deux voies (d'inversion et de Smirnoff-Wheeler) constituent donc les voies principales de biosynthèse de l'ascorbate (Figure 19). La voie d'inversion est majoritairement la voie de biosynthèse chez les animaux alors que la voie de Smirnoff-Wheeler (ou de non-inversion) est la voie de biosynthèse principale chez les

plantes. Une des principales caractéristiques de ces deux voies métaboliques concerne le dernier substrat intermédiaire permettant la synthèse d'ascorbate. Il s'agit du L-gulono-1,4-lactone et du L-galactono-1,4-lactone synthétisés respectivement par une succession de 7 et 8 catalyses enzymatiques dans les voies d'inversion et de Smirnoff-Wheeler (Hausladen and Kunert 1990; Wheeler, Jones et al. 1998; Smirnoff and Wheeler 2000). Chez les animaux, l'oxydation du L-gulono-1,4-lactone par la L-gulonolactone oxydase, enzyme associée à la membrane du réticulum endoplasmique, permet la formation de l'ascorbate (Linster and Van Schaftingen 2006). Cette enzyme est devenue non-fonctionnelle chez les primates au cours de l'évolution. Chez les plantes, la L-galactose déshydrogénase permet la formation d'ascorbate à partir du L-galactono-1,4-lactone (Wheeler, Jones et al. 1998). Outre ces deux voies principales, il existe trois autres voies alternatives de biosynthèse reliées soit à la voie d'inversion soit à la voie de Smirnoff-Wheeler (Figure 19). En effet, ces voies métaboliques alternatives ne permettent de réaliser que certaines étapes des voies principales. Chez les plantes, l'ascorbate est ainsi synthétisé dans l'espace intermembranaire des mitochondries et rejoint le cytoplasme par diffusion au travers de la membrane externe (Smirnoff and Pallanca 1996). Cependant, sa forte implication dans de nombreux processus suggère un acheminent facilité par des transporteurs. Des données mettent en évidence qu'il existerait un gradient de protons permettant le passage de l'Asc et de sa forme oxydée, le déshydroascorbate (DHA), au travers de la membrane plasmique (Rautenkranz, Li et al. 1994; Wheeler, Jones et al. 1998; Horemans, Foyer et al. 2000). Chez les animaux, le transport du DHA est réalisé par des transporteurs de glucose (Horemans, Foyer et al. 2000).



<u>Figure 19 :</u> Voies de biosynthèse de l'ascorbate (vitamine C) chez les plantes supérieures et les animaux ((Badejo and Esaka 2010)).

La voie D correspond à la voie retrouvée majoritairement chez les animaux. La voie B correspond à la voie de Smirnoff-Wheeler, voie majoritaire chez les plantes. Les voies alternatives putatives, car incomplètes, sont représentées en A, C et E. 1. phosphoglucose mutase ; 2. phosphoglucose isomérase (EC 5.3.9.1) ; 3. phosphomannose isomérase (EC 5.3.1.8) ; 4. phosphomannose mutase (EC 5.4.2.8) ; 5. GDP-mannose pyrophosphorylase (VTC1) (EC 2.7.7.22) ; 6. GDP-mannose-3',5'-épimerase (EC5.1.3.18) ; 7. GDP-L-galactose phosphorylase ; 8. L-galactose 1-phosphate phosphatase (VTC4) ; 9. L-galactose déshydrogénase ; 10. L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase (EC 1.3.2.3) ; 11. nucléotide pyrophosphatase ou sucre-1-P guanylyltransférase ; 12. sucre phosphatase ; 13. sucre déshydrogénase ; 14. UDP-glucose pyrophosphorylase ; 15. UDP-glucose déshydrogénase ; 16. UDP-glucuronate pyrophosphorylase ; 17. Glucuronate 1-kinase ; 18. d-glucuronate réductase ; 19. Aldonolactonase (EC 3.1.1.18) ; 20. L-gulonolactone oxidase ou déshydrogénase ; 21. myo-inositol 1-P synthase ; 22. myo-inositol 1-P phosphatase ; 23. myo-inositol oxygénase ; 24. (pectine) méthylesterase (EC 3.1.1.11); 25. D-galacturonate réductase (EC 1.1.1.203).

Du point de vue fonctionnel, l'ascorbate a un rôle prépondérant comme antioxydant. Il est capable de neutraliser directement les EORs telles que OH•, $O_2•^-$ et $^1O_2$, mais intervient également comme donneur d'électrons pour les ascorbate peroxydases lors du cycle Asc-GSH pour le piégeage d'H_2O_2 (Figure 20) (Conklin, Williams et al. 1996; Huang, He et al. 2005; Gao and Zhang 2008). Il permet ainsi de rapidement limiter les dommages photooxydatifs causés par les EORs lors de dysfonctionnements de la chaîne de transport d'électrons chloroplastique. Après oxydation, le premier produit formé est le monodéshydroascorbate (MDHA), molécule instable mais peu réactive à cause de son électron libre très excentré (Navas, Villalba et al. 1994). Le MDHA, en combinaison avec une autre molécule de MDHA, se transforme spontanément en DHA, forme oxydée majeure de l'Asc, et en Asc (Heber, Miyake et al. 1996; Asada 1999). Cette réaction peut cependant être catalysée par les MDHA réductases NADPH-dépendante cytosoliques et chloroplastiques mais également par les ferrédoxines des thylacoïdes (Asada 1999). Le DHA est majoritairement recyclé par les déshydroascorbate réductases (Figure 20) (Foyer and Halliwell 1976). En effet, ces dernières présentent une très grande efficacité catalytique de réduction du DHA comparée à la régénération directe et beaucoup plus lente par le GSH.

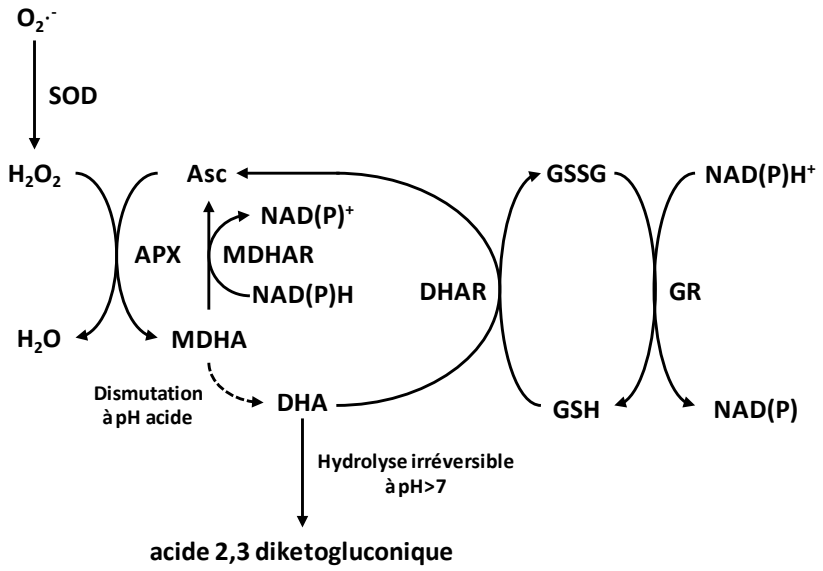


Figure 20 : Schéma représentant le cycle ascorbate-glutathion permettant de piéger les ions $O_2^{\cdot -}$ et de régénérer l'ascorbate (adapté de (Latowski, Surówka et al. 2010)).
Asc: ascorbate, APX: ascorbate peroxydase, DHA: déshydroascorbate, DHAR: déshydroascorbate réductase, MDHA: monodéshydroascorbate, GR: glutathion réductase, GSH: glutathion réduit, GSSG: glutathion oxydé.

A l'instar du glutathion, l'Asc est maintenu à plus de 90 % sous forme réduite, traduisant une forte implication de cette molécule dans la régulation des déséquilibres redox. En effet, la concentration intracellulaire en Asc et les niveaux d'activités enzymatiques de

son recyclage sont fortement augmentés lors de stress (Smirnoff 1995). L'Asc intervient également comme antioxydant secondaire dans les processus de régénération de l'α-tocophérol ou vitamine E (voir ci-dessous) (Thomas, McLean et al. 1992) et des ions métalliques tels que le fer et le cuivre (Padayatty, Katz et al. 2003). A l'instar du glutathion, de nombreux autres rôles ont été décrits. L'ascorbate permet, entre autres, la synthèse de certains antioxydants secondaires tels les flavonoïdes et les caroténoïdes mais également de certains alcaloïdes et de certaines hormones. Il est aussi impliqué dans la biosynthèse de l'éthylène, de la zéaxanthine et des gibbérellines en jouant le rôle de cofacteur de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase, de la violaxanthine dé-époxidase et de la gibbérelline 20-oxydase respectivement (Eskling and Åkerlund 1998; Smirnoff and Wheeler 2000). Différentes études mettent également en évidence son implication dans la croissance et la division cellulaire, l'extension de la paroi, la régulation de la photosynthèse et la protection des enzymes contenant un groupement prosthétique métallique (Padh 1990; Foyer, Lelandais et al. 1994; Forti and Elli 1995; Horemans, Foyer et al. 2000; Barba-Espin, Diaz-Vivancos et al. 2010). Au travers de ces diverses fonctions et de son rôle majeur d'antioxydant, l'Asc est d'une importance primordiale pour les plantes et les animaux.

2. Principaux métabolites secondaires impliqués dans la gestion du stress oxydant

a. Les terpènes et terpènoïdes

Le terme terpène dérive du mot turpentine ou térébenthine qui constitue une des premières huiles extraites du pistachier térébinthe (*Pistacia terebinthus*). Les terpènes correspondent à une classe d'hydrocarbures essentiellement synthétisés par les plantes supérieures, notamment les conifères. Ces molécules sont, en effet, les composants majeurs de la résine. Ils sont synthétisés à partir d'unités d'isoprènes plus ou moins nombreuses et ont pour formule chimique la répétition du motif isoprène $(C_5H_8)_n$ où n représente le nombre d'unités d'isoprènes. Certains insectes, champignons et bactéries sont également capables de produire ces molécules (Hojo, Toga et al. 2011; Sloan and Moran 2012; Wawrzyn, Bloch et al. 2012; Quin, Flynn et al. 2014). La polymérisation des unités isoprènes est réalisée à partir de l'isopentényl diphosphate (IPP) et du diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) (Chou and Keasling 2012). L'IPP est produit par l'intermédiaire de la voie dite du mevalonate (ou MVA) chez les animaux et les champignons, alors que chez les plantes et les bactéries, il est produit par la voie, dite, du méthyl-érythritol phosphate (ou MEP) souvent nommée voie non-mevalonate (Figure 21). Il est ensuite converti en DMAPP par l'isopentényl pyrophosphate

isomérase. Au cours de la biosynthèse des terpènes et des terpénoïdes, les condensations successives de l'IPP sur le DMAPP par des prényltransférases permettent la synthèse de précurseurs à chaînes hydrocarbonées plus ou moins longues qui sont ensuite utilisées comme substrat par les terpène synthétases, enzymes responsables de la diversification primaire des terpènes (Figure 22).

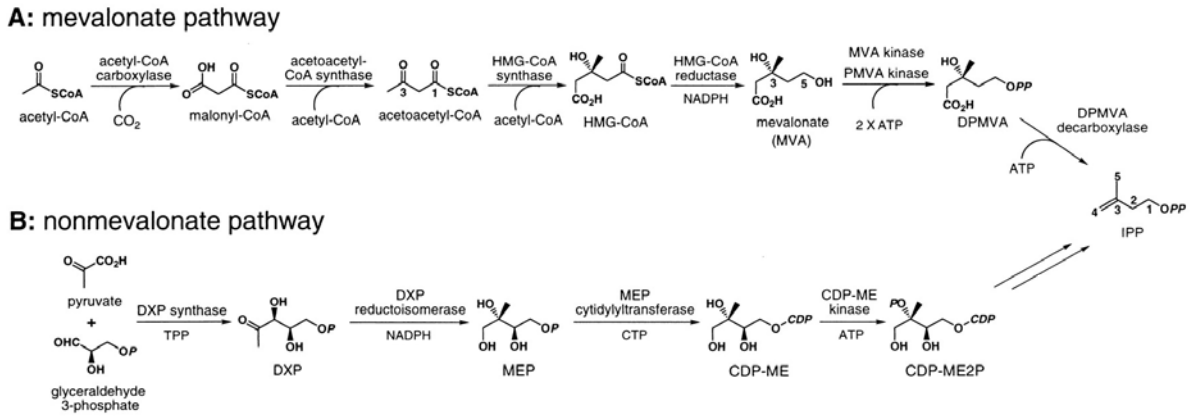


Figure 21 : Voies de biosynthèse des précurseurs nécessaires à la synthèse des terpènes ((Takagi, Kuzuyama et al. 2000)).

La voie du mévalonate (MVA) (A) est retrouvée chez les animaux et les champignons, alors que la voie du méthyl-érythritol phosphate (MEP) ou non-mévalonate (B) est présente chez les plantes et les bactéries. L'isopentényl diphosphate produit (IPP) est ensuite converti en diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) par l'isopentényl pyrophosphate isomérase.

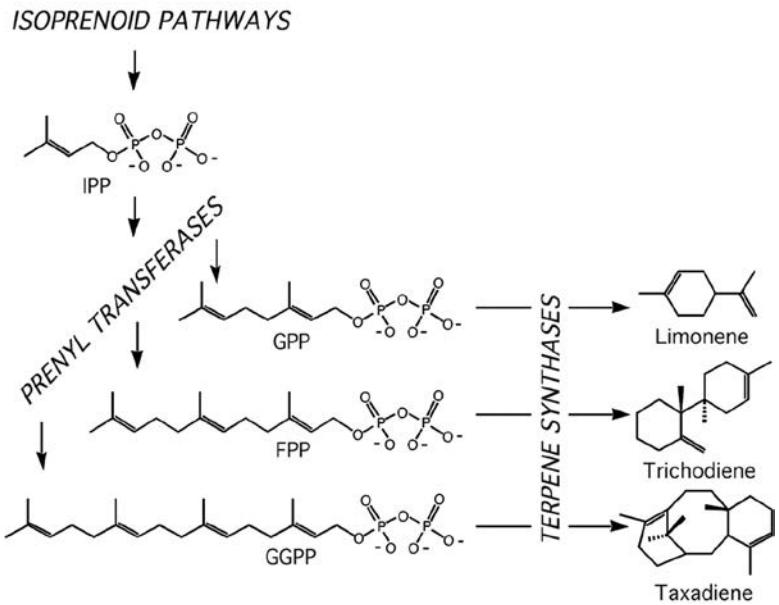


Figure 22 : Synthèse des terpènes ((Greenhagen and Chappell 2001)).

Les condensations successives et plus ou moins nombreuses d'isopentényl diphosphate (IPP) sur le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) permet la synthèse de précurseurs plus ou moins longs par les terpène synthétases. Ces dernières sont ainsi responsables de la production d'un nombre important de composés variés du fait des différentes réactions qu'elles peuvent catalyser. GPP, géranylpyrophosphate ; FPP, farnésylpyrophosphate ; GGPP, géranylgéranylpyrophosphate.

La complexification de la chaîne linéaire et/ou la cyclisation de certains composés par les terpène synthétases permet la production d'une vaste gamme de molécules (Trapp and Croteau 2001; Peralta-Yahya, Zhang et al. 2012; Weng, Philippe et al. 2012). Par exemple, le farnésyl diphosphate, substrat de certaines terpène synthétases, est à l'origine de plus de 300 composés différents se distinguant par la présence de chaînes hydrocarbonées linéaires ou aromatiques (Lopez-Gallego, Agger et al. 2010). De plus, à partir de ces terpènes, un grand nombre de composés variés peut être ensuite généré au travers d'activités enzymatiques catalysées, par exemple, par les cytochrome P450 monooxygénases (Lopez-Gallego, Agger et al. 2010; Wawrzyn, Bloch et al. 2012). Les terpénoïdes, quant à eux, sont des composés similaires aux terpènes mais présentent la plupart du temps des groupements fonctionnels supplémentaires tels que des fonctions alcools, aldéhydes ou cétones souvent dérivées de méthylation et/ou d'oxygénation. Cependant, ces composés peuvent également provenir d'un simple réarrangement du squelette carboné d'un terpène. Bien qu'il existe des terpénoïdes linéaires, la grande majorité de ces composés est constituée de molécules polycycliques. De plus, si les terpènes semblent restreints à certains groupes d'organismes comme les conifères, les terpénoïdes sont en revanche présents chez la plupart des organismes vivants et constituent le groupe le plus important de composés naturels. A l'heure actuelle, plus de 55000 terpénoïdes naturels ont été identifiés (Christianson 2008). Ce nombre important de molécules a inévitablement conduit à regrouper ces composés dans différentes familles de molécules. Par exemple, les stéroïdes sont des terpénoïdes dérivant de triterpènes. Si certains auteurs différencient les terpènes et les terpénoïdes, d'autres considèrent les terpénoïdes comme appartenant aux terpènes. L'ambiguïté de cette classification provient notamment du fait que les terpénoïdes sont le résultat de modifications chimiques, catalysées ou spontanées, des terpènes. Au sein de ces deux groupes, les différentes molécules sont classées en fonction du nombre de carbones (Cx) provenant d'unités d'isoprènes (UI) (McGarvey and Croteau 1995). Sont ainsi différenciées 7 sous-classes principales : les hémiterpènes (C5, 1 UI), les monoterpènes (C10, 2 UI), les sesquiterpènes (C15, 3 UI), les diterpènes (C20, 4 UI), les triterpènes (C30, 6 UI), les tetraterpènes (C40, 8 UI) et les polyterpènes ((C5)n, n UI avec $n \leq 30000$). Les terpènes et les terpénoïdes sont les constituants majeurs des huiles de nombreuses plantes et présentent généralement des odeurs et des couleurs caractéristiques. Bien que leurs fonctions *in vivo* ne soient pas toujours bien définies, ces molécules semblent jouer un rôle dans la protection ou la reproduction des plantes. Certaines odeurs libérées par ces molécules pourraient ainsi participer à la dissuasion des parasites ou des herbivores. À l'inverse, le parfum ou la couleur portée par certaines de ces molécules permettraient

l'attraction des pollinisateurs. A titre d'exemple, les terpénoïdes sont notamment responsables du parfum libéré par l'eucalyptus et par la menthe, de la saveur du gingembre et des couleurs jaunes et rouges du tournesol et de la tomate respectivement. En revanche, les taxanes, dérivés de diterpènes, confèrent des propriétés toxiques aux conifères les produisant. L'iridomyrmecine, produite par les fourmis du genre *Iridomyrmex*, possède des activités antimicrobiennes et insecticides (Harborne 1999). Les saponines, produites par de nombreuses plantes, et certains autres terpénoïdes présentent également des fonctions répulsives sur les herbivores (Paul 1992; Harborne 1999). Les strigolactones produites par certaines plantes permettent, quant à elles, la stimulation de la germination (Mori 2000). Enfin l'acide abscissique, qui appartient aux sesquiterpènes, est une hormone végétale primordiale fortement impliquée dans le fonctionnement cellulaire des plantes. Cette grande diversité de fonctions est notamment due au fait que certains terpènes et terpénoïdes servent de précurseurs à d'autres voies de biosynthèse telles que celle des caroténoïdes.

i. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments organiques lipophiles rencontrés chez les plantes, les animaux, les champignons, les bactéries et les archées halophiles. Tous les caroténoïdes sont des tétraterpénoïdes. Cependant, si la grande majorité des caroténoïdes présentent 40 carbones issus d'unités isoprènes, le nombre de carbones peut varier de 30 à 50. De plus, ces pigments peuvent présenter une structure totalement linéaire ou contenant des cycles. Ces cycles, au nombre de un ou deux, sont positionnés aux extrémités de la chaîne carbonée (Figure 23).

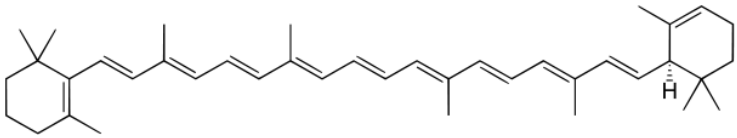


Figure 23 : Structure de l'α-carotène.

Seuls les organismes photosynthétiques et certains champignons et bactéries sont capables de synthétiser des caroténoïdes (Goodwin 1980). Les animaux, utilisant pourtant ces composés dans différentes voies métaboliques, doivent récupérer ces molécules au travers de leur alimentation (Armstrong and Hearst 1996). A l'heure actuelle, environ 750 structures naturelles de caroténoïdes ont été identifiées. Ces composés se regroupent en deux classes : les xanthophylles et les carotènes, distingués respectivement par la présence ou l'absence

d'atomes d'oxygène. Ces atomes d'oxygène, généralement situés aux extrémités de la molécule, sont présents sous la forme de groupements fonctionnels tels que des fonctions hydroxyles, cétones, époxys ou méthoxys. Chez les plantes, ces molécules sont essentiellement rencontrées au sein des chromoplastes et des chloroplastes. Tous les caroténoïdes sont synthétisés à partir du lycopène, caroténoïde linéaire dépourvu de groupement fonctionnel. Cette molécule dérive d'un précurseur, le géranylgéranyl pyrophosphate, utilisé par les terpène synthétases dans la voie de biosynthèse des terpènes (Cunningham and Gantt 1998). Par la suite, le lycopène est modifié par des lycopène cyclases afin de cycliser les caroténoïdes aux extrémités (Cunningham and Gantt 1998) (Figure 24). Ces composés cyclisés sont ensuite pris en charge par différentes enzymes telles que des hydroxylases, des époxidases, des méthoxidases et des dioxygénases. Le nombre important ainsi que la variété de ces enzymes est à mettre en relation avec la grande diversité de caroténoïdes existant (Cunningham and Gantt 1998). Par exemple, après cyclisation du lycopène par la lycopène β-cyclase, le β-carotène formé est hydroxylé puis doublement époxydé pour former la violaxanthine. Enfin, une dioxygénation de cette molécule aboutit à la formation de l'acide abscissique (Figure 24) (Cunningham and Gantt 1998). La présence d'une longue chaîne carbonée plus ou moins insaturée est responsable des deux propriétés principales portées par les caroténoïdes. En effet, si la chaîne carbonée leur confère une certaine lipophilie, les insaturations de cette chaîne, de par leur nombre et leur conjugaison, permettent aux caroténoïdes l'absorption d'énergie lumineuse entre 400 et 500 nm (Britton, Liaaen-Jensen et al. 1995). La couleur des caroténoïdes, allant du jaune pâle au rouge foncé, est à l'origine de la couleur des fruits et des fleurs par formation d'agrégats cristallins, comme chez la tomate, l'orange et la banane. L'accumulation de ces composés dans des tissus spécifiques semble constituer un facteur important quant à leur fonction. En effet, ceci favorise l'attraction des pollinisateurs et des agents de dissémination des graines inclus dans les fruits. Chez les animaux, ces couleurs sont en revanche ornementales et sont liées à la reproduction. Par exemple, l'attractivité sexuelle des flamands roses, des saumons et des oiseaux est une conséquence de l'intensité de la couleur de certaines parties de leur corps traduisant un bon état de santé (Figure 25) (Burley and Coopersmith 1987; Hill 1991; Gray 1996).

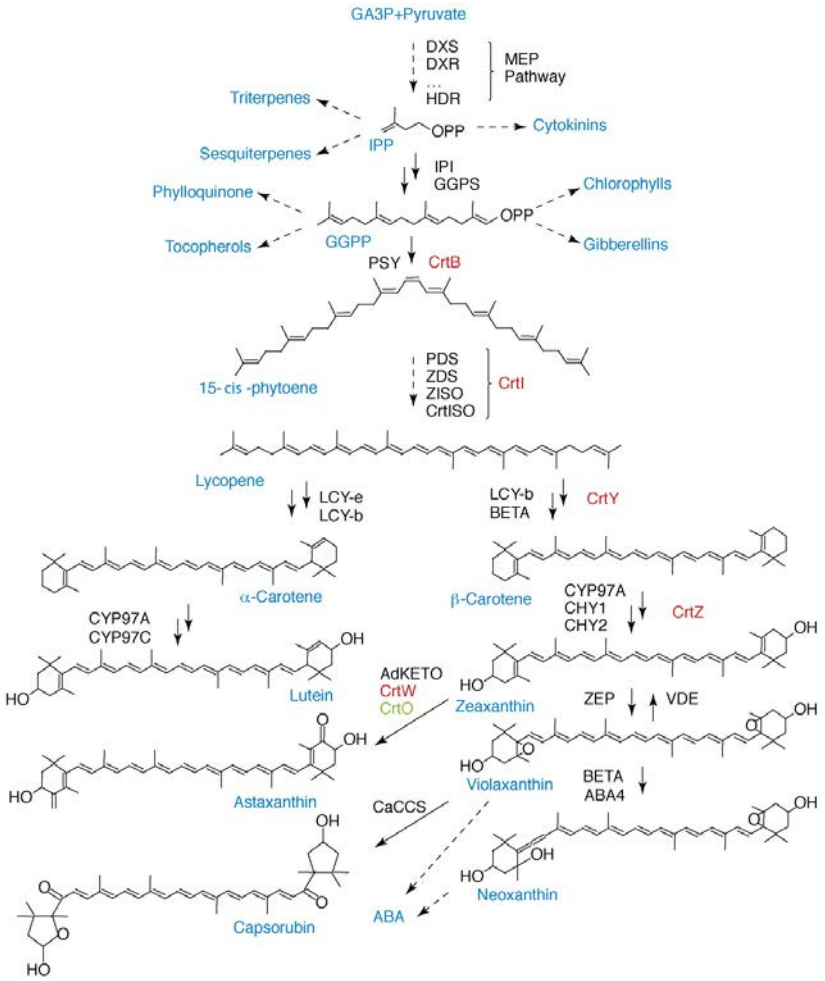


Figure 24 : Voies de biosynthèse des caroténoïdes.
Les noms des composés sont en bleu alors que les enzymes de plantes et de bactéries sont respectivement en noir et en rouge. L'enzyme CrtO retrouvée chez les algues et les cyanobactéries est en vert (tiré de (Giuliano, Tavazza et al. 2008)).

Les caroténoïdes sont également de très bons antioxydants de par leur structure carbonée linéaire et insaturée. En effet, ils sont capables de neutraliser des radicaux libres et des EORs. Ils permettent, par exemple, d'absorber l'excès d'énergie de l'oxygène singulet formé par le PSII lors de l'excitation de l'oxygène triplet (Telfer 2005). La zéaxanthine est également responsable de la protection des chloroplastes face aux dommages photooxydatifs. Cette molécule participe, lors d'un gradient transmembranaire excessif de protons, au changement de conformation de l'antenne collectrice du PSII afin de favoriser la dissipation thermique de l'énergie lumineuse reçue (Armstrong and Hearst 1996; Telfer 2005). La zéaxanthine résulte de la désépoxydation de la violaxanthine au travers du cycle des xanthophylles, dépendant de la présence d'Asc (Taiz and Zeiger 2006). Enfin, toujours au sein des chloroplastes, les caroténoïdes sont responsables de l'absorption d'une partie de l'énergie lumineuse utile pour la photosynthèse (Armstrong and Hearst 1996). Ils transfèrent

l'énergie absorbée du spectre bleu aux chlorophylles *a* en se positionnant dans les membranes des thylakoïdes, à proximité des centres réactionnels des PSII ou PSI (Britton, Liaaen-Jensen et al. 1995; Cunningham and Gantt 1998). Chez les animaux, outre l'activité antioxydante importante de ces composés, certains carotènes sont les précurseurs de la vitamine A (rétinol, rétinal et acide rétinoïque) régulant la croissance, le développement et le maintien du système immunitaire et de la vision (Figure 25) (Wolf 2001; Waris and Ahsan 2006; Tanumihardjo 2011). Les xanthophylles, quant à elles, permettent de protéger la rétine de l'œil. En effet, elles peuvent absorber l'énergie lumineuse dommageable telle que celle provenant du rayonnement ultra-violet. Chez les bactéries, certains caroténoïdes comme la staphyloxanthine de *Staphylococcus aureus* jouent un rôle prépondérant dans l'infection en inhibant les défenses immunitaires de l'hôte par neutralisation de ces attaques oxydatives (Liu, Essex et al. 2005). Enfin, l'association covalente d'une molécule de rétinal avec des protéines de la famille des opsines conduit à la formation des rhodopsines, pigments protéiques constitutifs des cellules photoréceptrices de l'œil des vertébrés et des arthropodes. Chez certaines archées halophiles, ces protéines, en utilisant la lumière comme source d'énergie, agissent comme pompes et sont responsables de la formation d'un gradient de protons intermembranaire nécessaire à la synthèse d'ATP (Hayashi, Tajkhorshid et al.). Les caroténoïdes produits par le métabolisme secondaire constituent donc une classe de composés non seulement impliqués dans la régulation des EORs mais également dans de nombreux autres processus cellulaires.

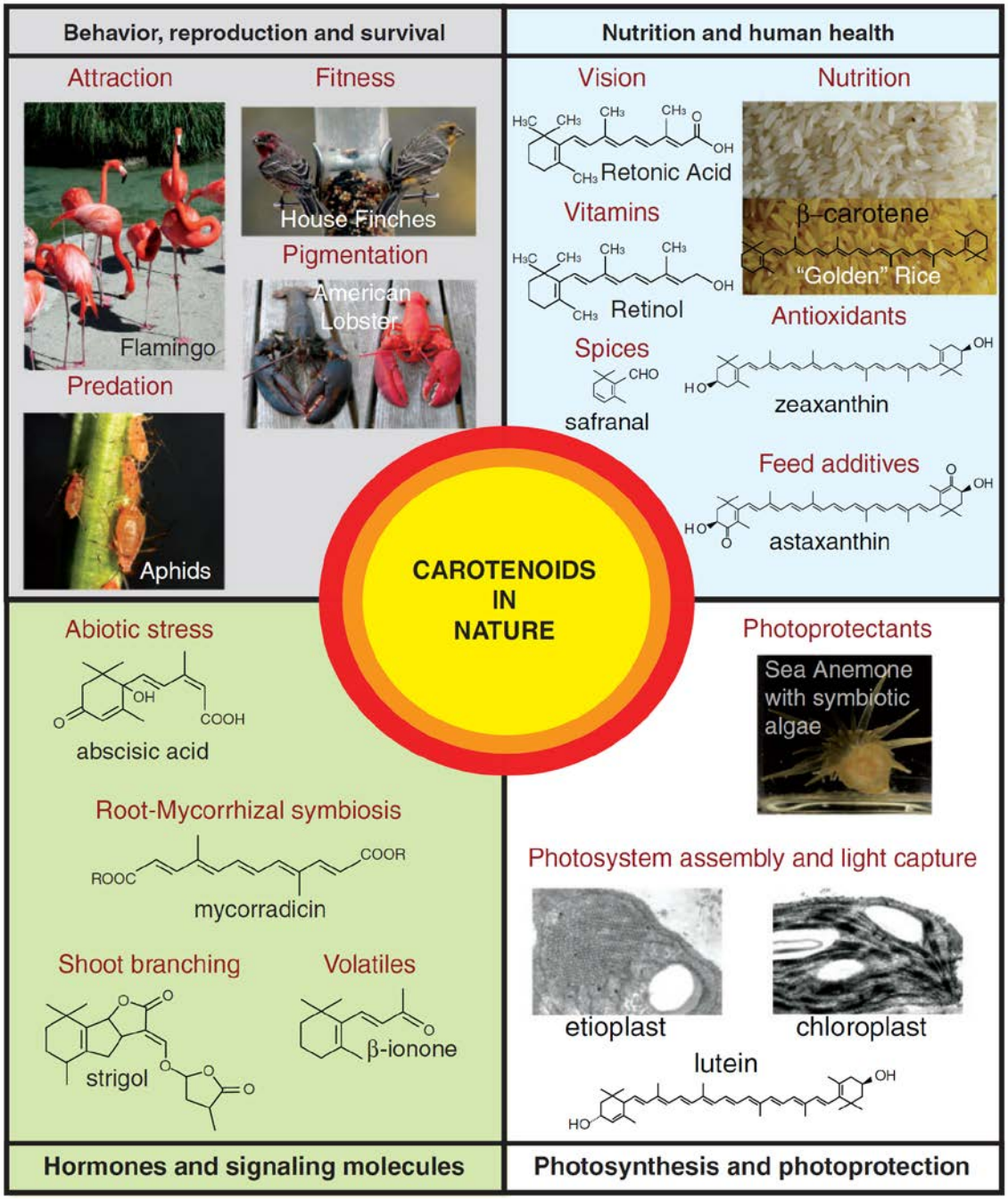


Figure 25 : Fonctions essentielles des caroténoïdes dans la nature ((Cazzonelli 2011)).
Les caroténoïdes jouent un rôle important dans (1) le comportement animal, la reproduction et la survie, (2) l'amélioration de la nutrition et de la santé humaine, (3) l'assemblage des photosystèmes permettant la capture de la lumière et la photoprotection et (4) la fourniture de substrats pour la biosynthèse des hormones végétales et des molécules de signalisation.

ii. Vitamine E : tocophérols et tocotriénols

L'activité associée à la vitamine E est portée par un groupe de huit molécules naturelles liposolubles, 4 tocophérols et 4 tocotriénols (Figure 26). Les tocophérols et les tocotriénols possèdent tous une structure basée sur un noyau chromane (structure bicyclique correspondant au benzodihydropyrane), substitué par un groupement hydroxyle en position 6 et une longue chaîne aliphatique de 13 carbones, porteuse de 3 méthylations (carbone 4, 8 et 12) en position 2 (Figure 27).

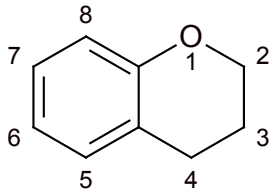
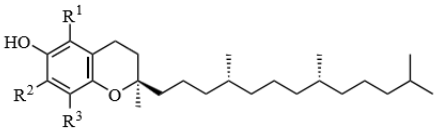


Figure 26 : Noyau chromane.
Le noyau chromane est constitué d'un cycle benzénique auquel est fusionné un hétérocycle hexagonal oxygéné.

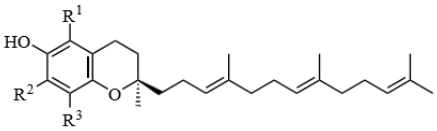
Les tocophérols et les tocotriénols se différencient par la présence de 3 double liaisons sur la chaîne aliphatique des tocotriénols, en positions 3, 7 et 11. Cette chaîne latérale est responsable de la liposolubilité de ces composés, ce qui leur permet notamment de se positionner au sein des membranes biologiques telles les membranes thylakoïdiennes. Enfin, parmi ces deux classes, les quatre molécules sont ensuite différenciées par l'ajout d'un préfix alpha (α), bêta (β), gamma (γ) et delta (δ) correspondant à la présence de méthylations supplémentaires sur le cycle chromane (Figure 26). L'α-tocophérol est la forme biologique la plus active alors que la plus abondante dans l'alimentation humaine est le γ-tocophérol. Le nom tocophérol, du grec *tókos* et *phérein*, respectivement naissance et porter/supporter, fut donné à ce groupe de molécules en raison de leur implication dans la fertilité des rats. Bien qu'essentiels pour les animaux, ces composés vitaminiques ne sont synthétisés que par les organismes photosynthétiques et quelques champignons. Ils doivent donc être apportés par le régime alimentaire. Chez les plantes, les tocophérols et les tocotriénols sont produits au niveau des chloroplastes et ne semblent présents qu'au sein des tissus verts (Fryer 1992; Ivanov and Khorobrykh 2003).

Substituants des tocophérols



R^1	R^2	R^3	Nom
CH_3	CH_3	CH_3	α-tocophérol
CH_3	H	CH_3	β-tocophérol
H	CH_3	CH_3	γ-tocophérol
H	H	CH_3	δ-tocophérol

Substituants des tocotriénols



R^1	R^2	R^3	Nom
CH_3	CH_3	CH_3	α-tocotriénol
CH_3	H	CH_3	β-tocotriénol
H	CH_3	CH_3	γ-tocotriénol
H	H	CH_3	δ-tocotriénol

Figure 27 : Structures semi-développées des vitamines E.
La vitamine E définie une activité portée par un groupe de molécules liposolubles regroupant huit molécules naturelles organiques, quatre tocophérols et quatre tocotriénols.

Il existe deux voies de biosynthèse pour la production de ces composés, distinctes par les précurseurs, mais similaires par les étapes enzymatiques (Figure 28). Les tocophérols et tocotriénols sont formés à partir de l'acide homogentisique. L'addition d'une molécule de phytyl pyrophosphate ou de géranylgéranyl pyrophosphate permet respectivement la formation des précurseurs des tocophérols et des tocotriénols. Une cyclisation ainsi que différentes méthylations de ces précurseurs permettent la formation des huit molécules naturelles (Cahoon, Hall et al. 2003). Ces vitamines sont cependant étudiées chez l'Homme presqu'exclusivement sous leur forme de tocophérols, notamment l'α-tocophérol. Elles permettent notamment de lutter contre de nombreuses maladies, telles que les maladies oculaires et cardiaques, la maladie d'Alzheimer et différents cancers. Les tocotriénols sont moins étudiés mais semblent également participer à ces fonctions et à la protection des neurones. Chez les plantes, ces molécules confèrent aux plantes une résistance face à de nombreux stress biotiques et/ou abiotiques tels que la salinité ou la sécheresse. Toutes ces fonctions sont très fortement liées à leurs propriétés antioxydantes, principal rôle de ces molécules. En effet, les tocophérols et les tocotriénols sont de très bons antioxydants responsables de la neutralisation des radicaux libres et des EORs, notamment $^1O_2$, $O_2\bullet^-$ et OH• (Hollander-Czytko, Grabowski et al. 2005; Kruk, Hollander-Czytko et al. 2005). Leur structure leur permet de capter ces espèces chimiques par la présence d'une fonction hydroxyle portée par le noyau chromane. Ils peuvent réaliser cette action aussi bien dans les zones hydrophiles à la surface des membranes que dans les zones lipophiles due à l'enchâssement de la chaîne phytyle ou géranylgéranyle (Kamal-Eldin and Appelqvist 1996).

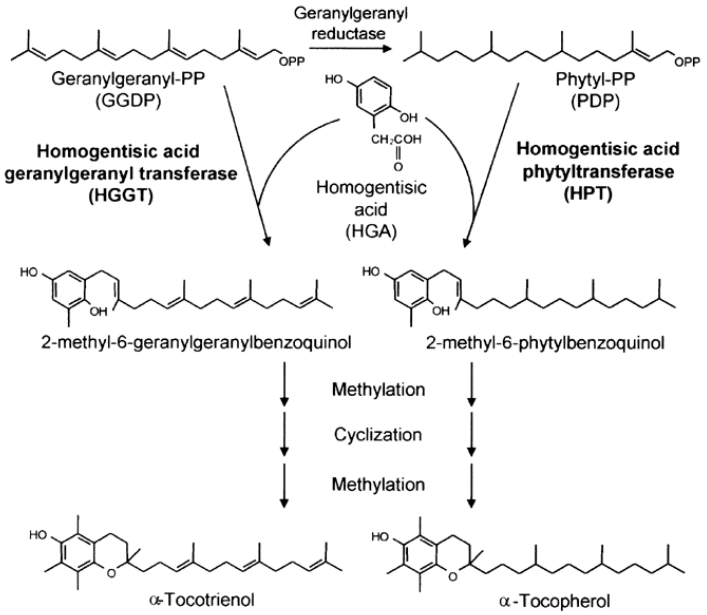


Figure 28 : Voie de biosynthèse des tocophérols et des tocotriénols ((Cahoon, Hall et al. 2003)).
Le transfert du géranylgéranyl pyrophosphate ou du phytyl pyrophosphate sur l'acide homogentisique permet la formation respective du précurseur des tocotriénols et des tocophérols. La cyclisation et les méthylations plus ou moins nombreuses de ces précurseurs aboutissent à la production des huit différentes molécules naturelles à activité vitamine E.

Cette hydrophobicité conditionne ainsi leur rôle primordial de molécule antioxydante en stoppant les réactions en chaînes de peroxydation lipidique par réduction des radicaux lipidiques intermédiaires formés (Figure 29) (Liebler, Kling et al. 1986; Blokhina, Virolainen et al. 2003). Le radical tocophéryle obtenu est ensuite régénéré par réduction par d'autres antioxydants tels que le rétinol ou l'ubiquinol mais très généralement par l'Asc.

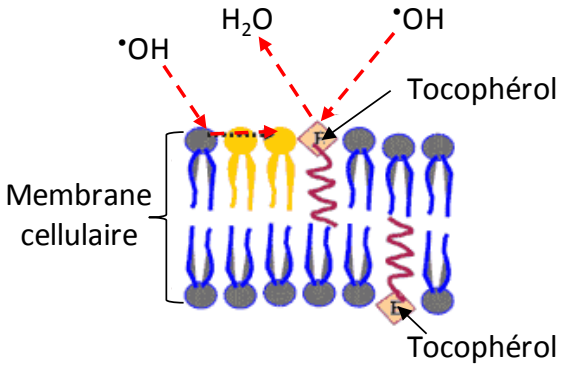


Figure 29 : Arrêt de la peroxydation lipidique en chaîne par les tocophérols.
L'hydrophobicité des tocophérols et des tocotriénols leur permet un enchâssement dans les membranes biologiques. Ils peuvent ainsi stopper la réaction de peroxydation lipidique en chaîne par le groupement hydroxyle de leur noyau chromane en interagissant avec le radical lipidique. De plus, cette « tête » hydrophile peut également capter les radicaux présents dans le milieu cellulaire ou extérieur.

D'autres fonctions, essentiellement chez l'Homme et sans lien direct avec leurs capacités antioxydantes, ont été décrites. Les tocophérols et les tocotriénols permettraient la régulation enzymatique et génétique de la croissance tissulaire de certains tissus et inhiberaient l'agrégation plaquettaire. Lors de déficience en vitamine E, des compléments alimentaires riches en esters de tocophérols, plus stables, sont utilisés pour pallier ce manque. L'étude *in vitro* de ces composés a mis en évidence que certaines GSTs interagissaient avec ces composés de façon non catalytique. Ces esters de tocophérols se fixent ainsi de manière non-covalente sur ces protéines au travers d'un site différent du site catalytique de l'enzyme (Sampayo-Reyes and Zakharyan 2006). Bien que cette fonction ne soit pas encore élucidée, il est probable, à l'instar d'autres GSTs et d'autres molécules, que ces enzymes participent au transport et/ou au stockage de ces composés. Cependant, ces esters de tocophérols sont désestérifiés lors de l'ingestion et se retrouvent ainsi sous la forme de tocophérols libres dans l'organisme. L'implication des GSTs vis-à-vis du transport de ces molécules ou plus généralement sur les composés à structure similaire reste à éclaircir. Les « vitamines E » constituent donc un groupe de molécules aux caractères antioxydants et aux fonctions diverses. Cependant, ces composés, très similaires structuralement aux composés phénoliques, ne peuvent pas être regroupés dans la superfamille des polyphénols. En effet, les composés phénoliques dérivent tous d'une même voie de biosynthèse qui est différente de celle des vitamines E.

b. Composés phénoliques et polyphénols

Les composés phénoliques sont constitués, *a minima*, d'un cycle aromatique hydrocarboné substitué par un groupement hydroxyle (phénol) et sont majoritairement produits par les plantes et les microorganismes. Bien que cette fonction hydroxyle soit similaire à celle portée par les alcools, cette fonction présente des propriétés chimiques différentes. En effet, les composés phénoliques sont plus acides du fait de l'insaturation du cycle hydrocarboné. De plus, la liaison entre l'oxygène et l'hydrogène est relativement moins forte que chez les alcools, permettant une réactivité du groupement hydroxyle plus élevée. Ces composés sont capables d'interagir avec de nombreuses molécules telles que les sucres ou les lipides et sont sensibles à l'oxydation. Cette tendance à l'oxydation non-enzymatique est notamment visible lors du brunissement des fruits et des légumes comme la banane, la pomme ou la carotte. Il est important de noter que d'autres types de métabolites secondaires, comme les alcaloïdes ou les terpénoïdes, notamment la classe des stéroïdes, possèdent également des cycles phénoliques. Cependant, la voie de biosynthèse propre aux composés

phénoliques permet de les différencier des autres familles de métabolites secondaires. Les composés phénoliques sont ainsi formés au travers de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes qui utilise comme précurseur l'acide cinnamique (Figure 30). Cet acide provient de la première étape de synthèse catalysée par la phénylalanine ammonia-lyase dont le substrat est la phénylalanine. L'acide cinnamique est ensuite converti en acide coumarique puis en 4-coumaroyl-CoA. Une voie alternative utilisant la tyrosine comme acide aminé permet également la synthèse de l'acide coumarique. Le 4-coumaroyl-CoA constitue le précurseur à la synthèse de différentes classes de métabolites secondaires. En effet, les étapes de synthèse successives à la formation de ce composé comportent de nombreuses enzymes responsables de la production d'un grand nombre de molécules. Les composés phénoliques constituent ainsi un groupe d'une extrême diversité aux fonctions très variées. Il peut ainsi s'agir de rôle de défense vis-à-vis de pathogènes, de protection contre des stress abiotiques comme les rayons UV, d'antioxydants, ou de composants structuraux. Pour leurs intérêts industriels, certains sont également utilisés par l'Homme comme pesticides, insecticides, exhausteurs de gout ou additifs alimentaires. L'intérêt métabolique des antioxydants alimentaires fait, à l'heure actuelle, l'objet d'un grand nombre de travaux de recherche. Parmi ces antioxydants, de nombreux auteurs ont mis en évidence le rôle prépondérant des polyphénols (Subirade, Fernandez et al. 1995). La classe de composés la plus étudiée et comportant le plus grand nombre de molécules identifiées concerne les flavonoïdes. Ces molécules présentent des activités antioxydantes importantes et certaines GSTs semblent impliquées dans leur recyclage. Enfin, les coumarines et les stillbénoïdes seront également présentées pour leur activité antioxydante et leur structure similaire aux flavonoïdes et aux tocophérols.

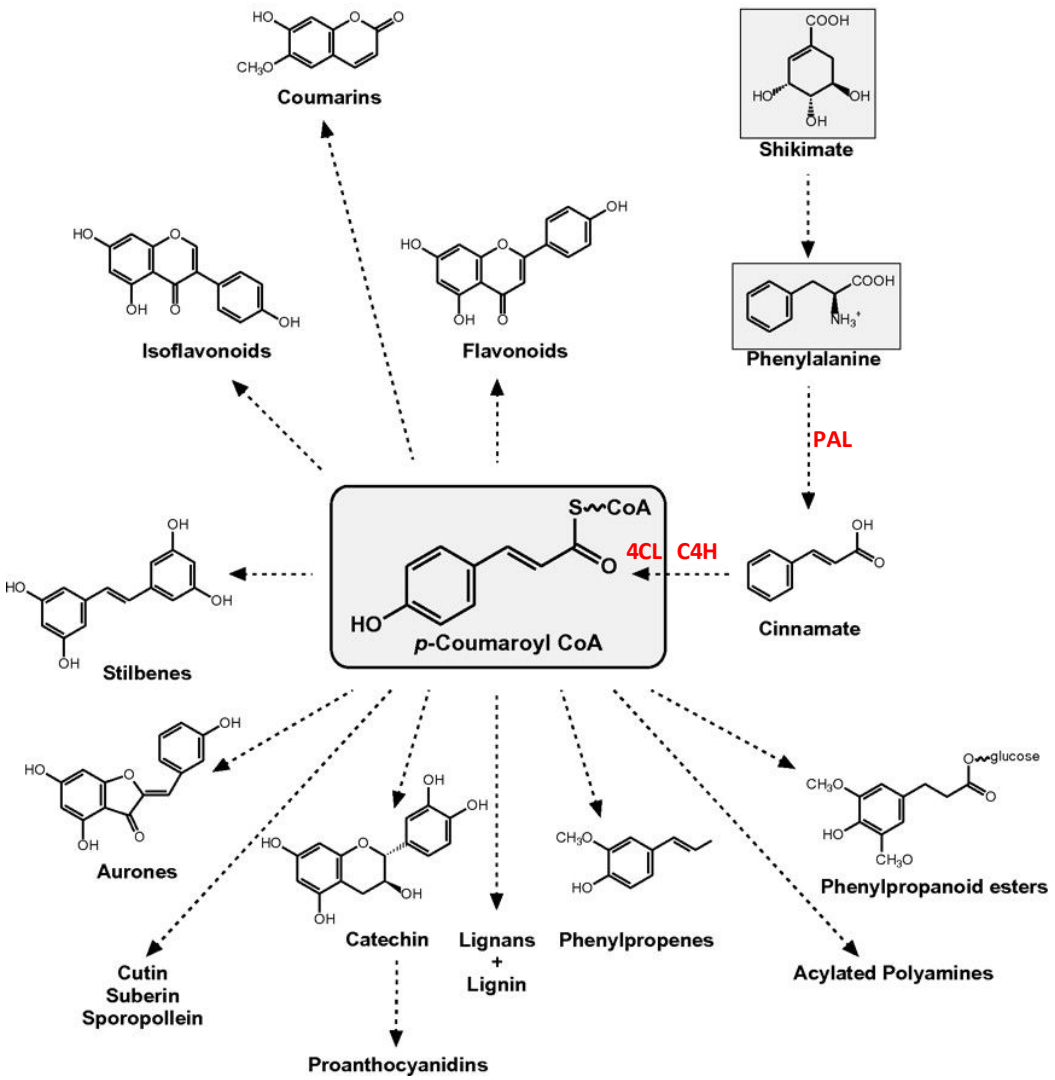


Figure 30 : Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes ((Vogt 2010)).

La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes a pour précurseur le cinnamate provenant de la conversion de la phénylalanine (voie du shikimate) par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL). Le cinnamate est ensuite transformé en acide coumarique par la cinnamate-4-hydroxylase. Enfin, la 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL) permet de produire le coumaroyl-CoA, précurseur de nombreuses voies métaboliques de biosynthèse des composés phénoliques.

i. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires constitués d'une structure de base à 15 carbones, le squelette 1,3-diphénylpropane, formé par deux cycles phényles (A et B) reliés par une chaîne à trois carbones fermée en un hétérocycle oxygéné hexagonal (C). La fusion entre le cycle A et le cycle C aboutit à la formation d'un noyau chromene (ou benzopyrane) (Figure 31). Les flavonoïdes regroupent aujourd'hui une classe de métabolites secondaires très représentés chez les plantes. La première molécule, un glycoside de quercetine, a été identifiée à partir d'agrumes dans les années 1930. Il lui a été donné le nom de flavonoïde, de *flavus* en latin signifiant jaune, pour sa couleur très marquée. Les noms de vitamine P, pour

perméabilité, ou C2 ont également été utilisé respectivement pour son implication dans la perméabilité des capillaires sanguins et pour son amélioration dans l'absorption de la vitamine C (Bruckner and Szent-Györgyi 1936). Cependant, les études sur ce composé depuis la fin des années 1930 ont conduit, dans les années 1950, à abandonner ce terme de vitamine P puisqu'aucun symptôme particulier n'était visible en cas de carence en cette molécule chez l'Homme (Mobh 1939).

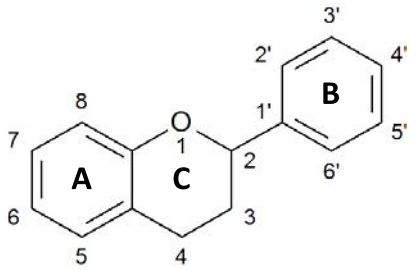


Figure 31 : Structure de base des flavonoïdes.
Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, constitué de deux cycles benzéniques (cycles A et B) reliés par une chaîne à trois carbones. Le pont à 3 carbones entre les deux phényls forme généralement un troisième cycle pyrone (C) aboutissant à un noyau chromane. La distinction entre sous-classes se fait sur la conformation de cette structure centrale C.

Les flavonoïdes au sens large sont produits au travers de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Figure 30). La phénylalanine est ainsi le précurseur permettant la formation du coumaroyl-CoA (Ververidis, Trantas et al. 2007). La combinaison de ce produit avec le malonyl-CoA par la chalcone synthétase aboutit à la production des chalconoïdes, classe de métabolites secondaires servant notamment à la synthèse des flavonoïdes. En effet, l'énolisation de ces molécules est responsable de la fermeture du cycle C et donc de la formation de la structure de base à 3 cycles de tous les flavonoïdes. Les différents flavonoïdes sont par la suite produits par une série de modifications catalysées par de nombreuses enzymes telles que des oxygénases, des réductases, des méthylases, des estérases ou des glycosyl-transférases (Figure 32) (Ververidis, Trantas et al. 2007). Ainsi, plus de 5000 molécules différentes étaient recensés en 2007 (Ververidis, Trantas et al. 2007). La classification des flavonoïdes est entièrement basée sur la structure des composés. Onze sous-classes sont différenciées par les paramètres structuraux du cycle C comprenant (i) la présence d'une fonction cétone, (ii) son niveau de saturation, (iii) la présence de fonctions hydroxyles, (iv) la position du cycle B sur ce cycle et enfin (v) sa possibilité d'être sous forme ionique (ion flavylium) (Figure 32 et 34). La fonction cétone du cycle C, souvent présente, aboutit soit à un noyau chromone, soit à un noyau coumarine (voir le paragraphe sur les coumarines) (Figure 33).

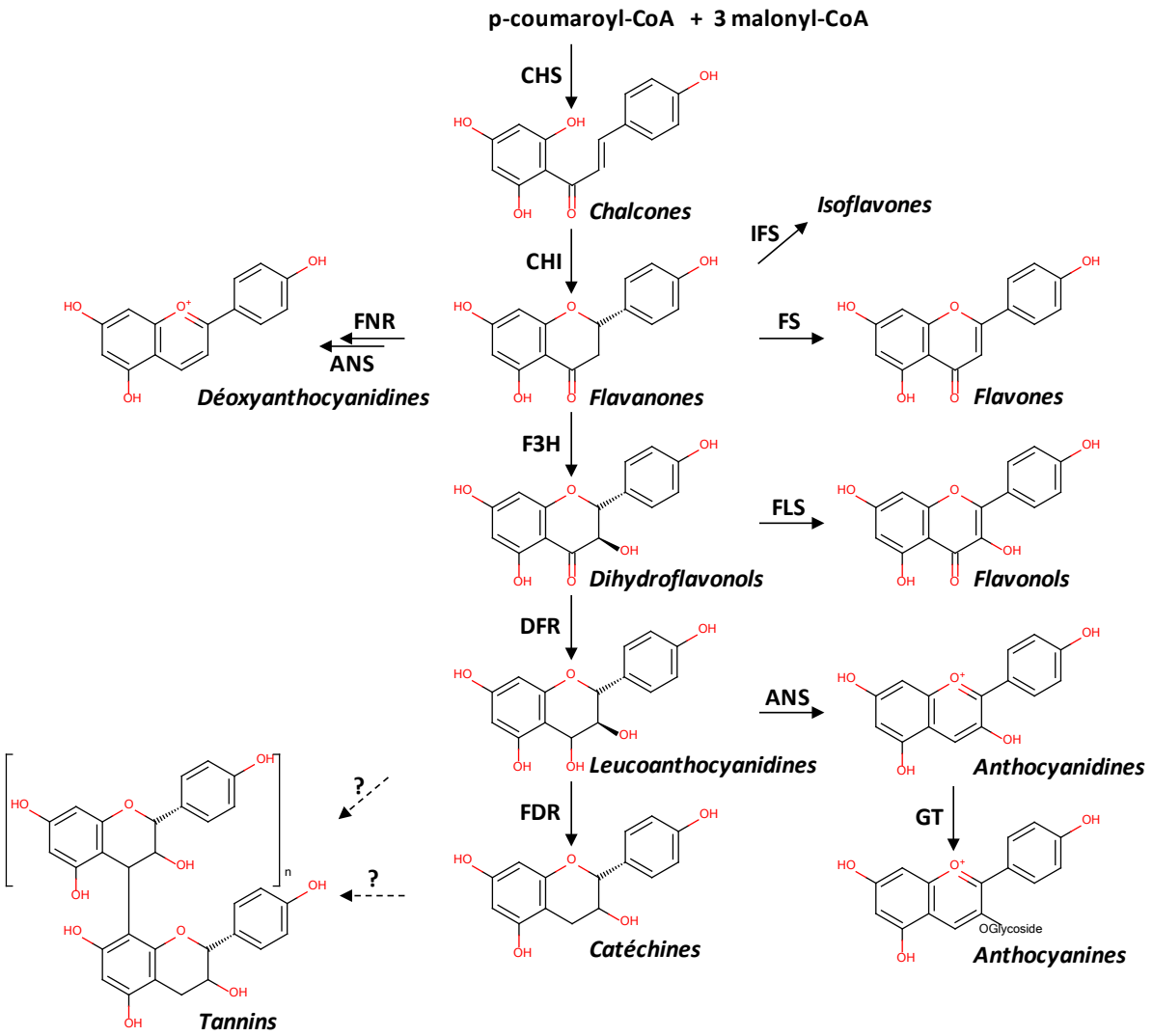


Figure 32 : Schéma de biosynthèse simplifié de quelques classes de flavonoïdes (d'après (Heller, Forkmann et al. 1994; Macheix, Fleuriet et al. 2005)).

Les flavonoïdes sont synthétisés à partir du coumaroyl-CoA et du malonyl-CoA au travers de la réaction catalysée par la chalcone synthétase. Après cyclisation par énolysation du cycle C, les différentes classes de flavonoïdes et de flavanoïdes sont produites suite à de nombreuses réactions, notamment des hydroxylations et des réductions. Seules les structures de base et les substitutions hydroxyles les plus fréquentes sont représentées. CHS, chalcone synthétase ; CHI, chalcone isomérase ; IFS, isoflavone synthétase ; FS, flavone synthétase ; FNR, flavanone réductase ; ANS, anthocyanidine synthétase ; F3H, flavanone-3-hydroxylase; FLS, flavonol synthétase ; DFR, dihydroflavonol réductase ; FDR, flavandiol réductase ; GT, glucosyltransférase

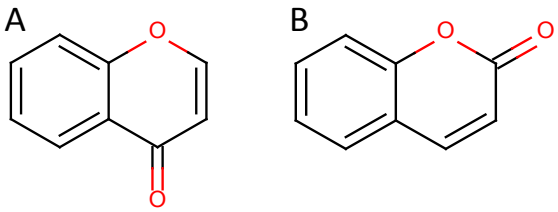
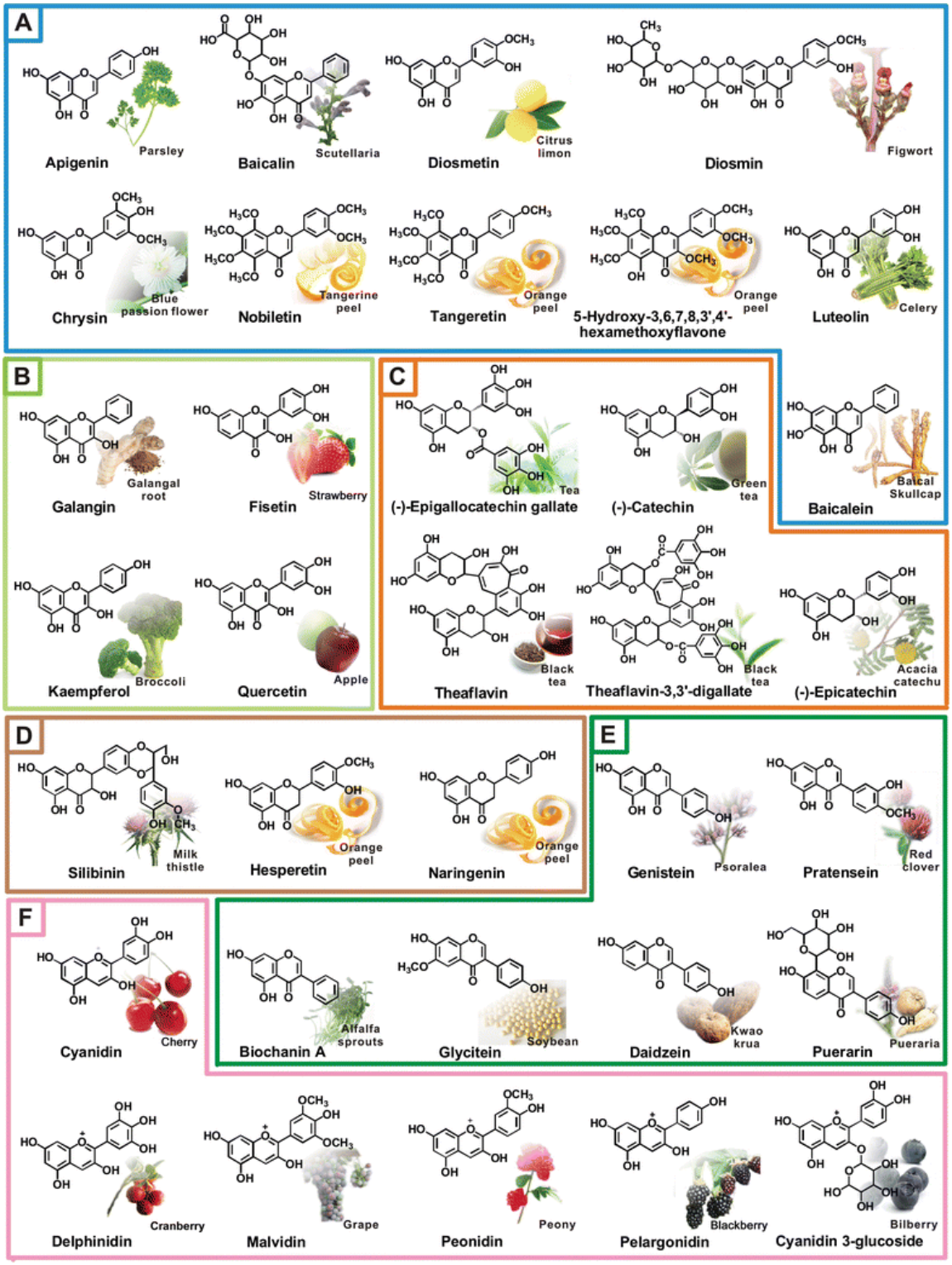


Figure 33 : Représentation des noyaux chromone et coumarine.

Les noyaux chromone (A) et coumarine (B) sont constitués d'un cycle benzénique auquel est fusionné un cycle hexagonal oxygéné porteur d'une fonction cétone. Ces noyaux se distinguent par la position de cette fonction cétone.

Les flavonoïdes, au sens large, sont des composés trouvés chez de nombreuses plantes terrestres, notamment les angiospermes, et sont le plus souvent sous formes solubles glycosylées. Ils sont notamment responsables, sous forme de pigments dissous et stockés dans les vacuoles, de la couleur des fleurs et des fruits, avec un rôle similaire aux caroténoïdes (Figure 34). En revanche, comparés à ces derniers, les flavonoïdes couvrent une gamme de couleur, non plus restreinte au jaune, mais allant du rouge au violet. De plus, leur absorption dans l'ultraviolet permet une perception accrue des fleurs par les insectes (Bruneton 2009). Cette attraction des animaux pollinisateurs constitue sans doute une des fonctions les plus importantes des flavonoïdes chez les plantes. Chez les légumineuses, les flavonoïdes participent à la formation des nodules fixateurs d'azote. La sécrétion de flavonoïdes est perçue par des bactéries qui à leur tour excrètent un composé reconnu par la plante. Ceci enclenchera la formation des nodules (Hartwig, Joseph et al. 1991).



<u>Figure 34 :</u> Exemples de flavonoïdes contenus dans des fruits, des fleurs et divers tissus ((Pan, Lai et al. 2010)).

Représentation de flavonoïdes naturels appartenant à différentes classes : (A) flavones, (B) flavonols, (C) flavanols, (D) flavanones, (E) isoflavones et (F) anthocyanidines.

Un autre rôle primordial des flavonoïdes réside dans leur forte implication dans la lutte contre différents stress, notamment ceux constitués ou engendrant un stress oxydant. En effet, ils sont une source importante d'antioxydants par leurs fonctions hydroxyles piégeant les peroxydes et les EORs et par leur capacité à chélater les métaux de transition tels que le cuivre et le fer (van Acker, Tromp et al. 1995; Fraga, Galleano et al. 2010; Galleano, Verstraeten et al. 2010). Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des EORs (Fuhrman, Lavy et al. 1995). *In vivo*, l'administration de flavonoïdes chez les rats permet de neutraliser les EORs (Bagchi, Milnes et al. 1999). Cependant, cette activité est très dépendante de quatre paramètres. La structure ortho-diphénolique du cycle B, la présence de fonctions hydroxyles en positions 3 et 5, la présence d'une double liaison en position 2-3 et enfin la présence d'une fonction cétone au niveau du cycle C semblent primordiales pour des activités anti-radicalaires et anti-oxydantes maximales (Figure 35). Les flavonoïdes, dont la quercétine, qui présentent ces quatre éléments structuraux sont des piégeurs d'EORs très efficaces (Erben-Russ, Bors et al. 1987). De plus, ils permettent également d'inhiber la peroxydation lipidique (Yoshino, Tomita et al. 1994).

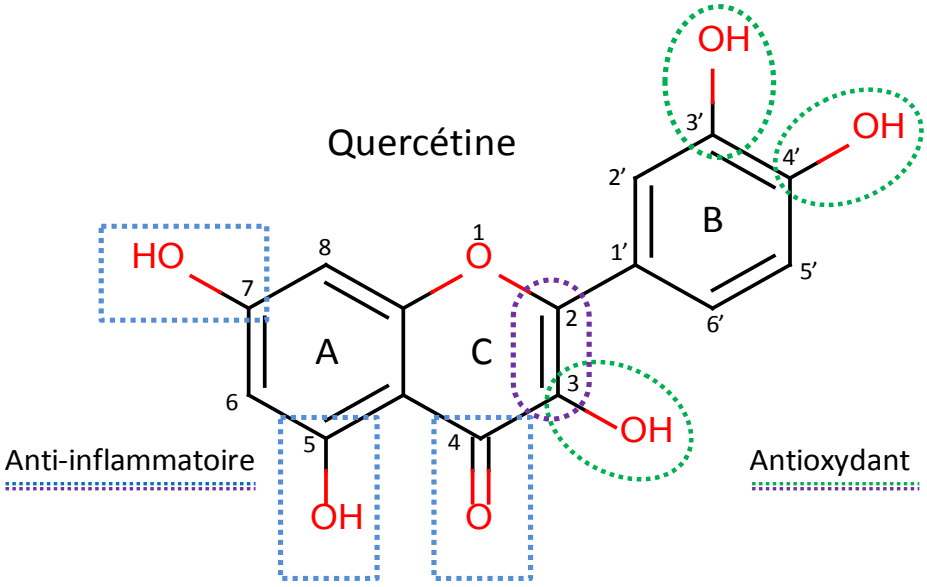


Figure 35 : Représentation des paramètres majeurs liés aux activités antioxydantes et anti-inflammatoires des flavonoïdes.
La molécule de quercétine est constituée de tous les paramètres majeurs permettant des activités antioxydantes et anti-inflammatoires maximales. Les groupements fonctionnels (hydroxyle et cétone) nécessaire à ces activités maximales sont entourés en vert et en bleu respectivement pour l'activité antioxydante et anti-inflammatoire. La double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C intervient dans ces deux types d'activités. Elle est encadrée en violet.

Cette propriété antioxydante des flavonoïdes est d'ailleurs à l'origine du paradoxe français, à savoir qu'une grande partie des français ingère autant de graisses animales que les

américains tout en présentant un risque cardiovasculaire plus faible. Dans les faits, la consommation additionnelle de vin rouge, riche en flavonoïdes, augmente fortement les capacités antioxydantes du plasma. Ceci permet de diminuer la peroxidation lipidique des cellules endothéliales en inhibant l'oxydation des lipoprotéines (Fuhrman, Lavy et al. 1995; Whitehead, Robinson et al. 1995; Commenges, Scotet et al. 2000). Chez l'Homme, cette capacité antioxydante des flavonoïdes se traduit également par des fonctions anti-inflammatoires (Figure 35) (Emim, Oliveira et al. 1994; Galati, Monforte et al. 1994; Read 1995). Les cyanidines, appartenant aux anthocyanidines, sont notamment impliquées dans cette fonction. Elles permettent de réguler le mécanisme anti-inflammatoire par l'intermédiaire d'une régulation redox de l'activité des protéines impliquées telles que les cyclooxygénases et les lipoxygénases (Yamamoto and Gaynor 2001; Izzi, Masuelli et al. 2012; Martinez-Micaelo, Gonzalez-Abuin et al. 2012). De plus, de nombreux flavonoïdes sont également capables de contrer la production d'EORs par les neutrophiles. Cette production accrue d'EORs, accompagnant la phagocytose lors d'une infection virale ou bactérienne, est responsable de la réaction inflammatoire sous-jacente (Limasset, le Doucen et al. 1993). Cependant, la faible absorption des flavonoïdes par le corps humain (environ 5 %) suggère un rôle de second messager de ces molécules pour la synthèse d'autres dérivés chez les mammifères (Williams, Spencer et al. 2004). De façon non exhaustive, les flavonoïdes sont également impliqués dans la résistance à certains stress par leur capacité à filtrer les UV et leurs propriétés antibactériennes (Cushnie and Lamb 2011), antifongiques (Cushnie and Lamb 2005) et antivirales (Taylor, Hamilton-Miller et al. 2005; Friedman 2007). Par exemple, l'administration quotidienne de dérivés de quercétine permet de protéger les souris d'une infection virale en inhibant la synthèse des protéines virales (Vrijsen, Everaert et al. 1987). Chez l'Homme, différentes études ont pu montrer que les flavonoïdes ralentissent aussi l'infection par les virus de l'herpès et du SIDA (Mucsi and Pragai 1985; Spedding, Ratty et al. 1989; Mahmood, Pizza et al. 1993). Outre ces fonctions, les flavonoïdes possèdent également des propriétés antiallergiques (Yamamoto and Gaynor 2001) et anticancéreuses (Cazarolli, Zanatta et al. 2008) bien que certains composés semblent aussi cancérigènes *in vitro* (Bandele, Clawson et al. 2008). La quercétine, administrée chez le rat, permet ainsi de diminuer l'incidence de molécules pro-cancéreuses (Kato, Nakadate et al. 1983; Verma, Johnson et al. 1988). Il est suggéré que ce composé interagit, de façon antagoniste, avec le complexe calcium-calmoduline permettant ainsi une diminution de la synthèse d'ADN induite par des pro-cancéreux (Verma and Boutwell 1981; Nishino, Naitoh et al. 1984). Enfin, les flavonoïdes tels que la quercétine interfèrent avec le métabolisme des

xénobiotiques chez les rongeurs en stimulant les systèmes de détoxication, notamment au travers de l'induction de gènes codant des glutathion transférases (Bu-Abbas, Clifford et al. 1995; Nijhoff, Bosboom et al. 1995) enzymes probablement impliquées dans le recyclage de flavonoïdes, notamment au travers de la réduction de composés oxydés comme la quercétine (Dixon and Edwards 2010). Par leurs nombreuses fonctions, l'impact des flavonoïdes sur le métabolisme cellulaire semble très important, notamment vis-à-vis d'agressions extérieures.

ii. Les coumarines

Les coumarines constituent une classe de polyphénols ayant pour squelette carboné de base un noyau benzopyrone de type coumarine (Figure 33). Le nom de coumarines provient de *kumarú*, nom amérindien désignant le teck brésilien, arbre produisant la fève tonka d'où la première coumarine a été isolée en 1820. Cette famille de molécules se divise aujourd'hui en trois sous-classes : les coumarines, les furocoumarines et les pyrocoumarines (Figure 36). Les coumarines, au sens strict, sont constituées du squelette benzopyrone alors que les furano (ou furocoumarines) et les pyrano (ou pyrocoumarines) possèdent respectivement un cycle furane ou un cycle pyrane supplémentaire sur ce squelette. L'addition de ce cycle permet de séparer à nouveau ces molécules en deux groupes distincts que sont les furo ou pyrocoumarines linéaires et les furo ou pyrocoumarines angulaires. Les substitutions plus ou moins nombreuses sur ces trois noyaux de base résultent en un nombre important de composés différents.

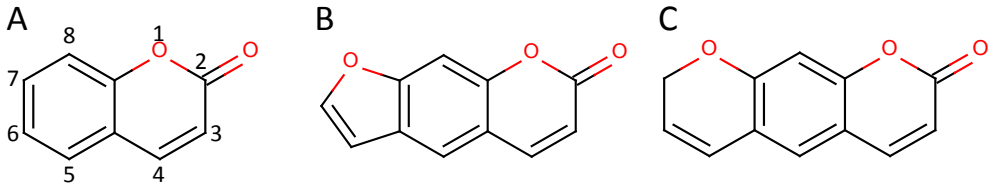


Figure 36 : Représentation de la structure de base des coumarines, furocoumarines et pyrocoumarines.
Les coumarines (A) sont constituées d'un cycle benzénique auquel est fusionné un cycle hexagonal oxygéné porteur d'une fonction cétone. L'ajout d'un cycle furane ou pyrane permet respectivement de former les noyaux des furocoumarines (B) et des pyrocoumarines (C).

En 2002, plus de 1300 coumarines naturelles étaient recensées (Murray 2002). Tous ces composés sont produits par les plantes, notamment les rutacées et les ombellifères, certains champignons et certaines bactéries (Hoult and Paya 1996; Murray 2002). Les coumarines au sens large sont synthétisées à partir de la phénylalanine au travers des voies de biosynthèse du shikimate et des phénylpropanoïdes. À l'instar des flavonoïdes, le coumaroyl-

CoA est aussi le précurseur des coumarines (Figure 37) (Bourgaud, Hehn et al. 2006). Les différentes molécules sont produites à partir de ce composé par différentes catalyses enzymatiques permettant notamment l'ajout des cycles furane ou pyrane mais également de groupements fonctionnels (hydroxylation, glycosylation, méthylation, cyclisation, transfert de groupement, oxygénation, etc.). Parmi tous les substituant rencontrés, il est très commun de trouver des fonctions hydroxyles et méthoxyles mais également des groupements plus complexes tels que des glycosides et des dérivés terpéniques de taille variable.

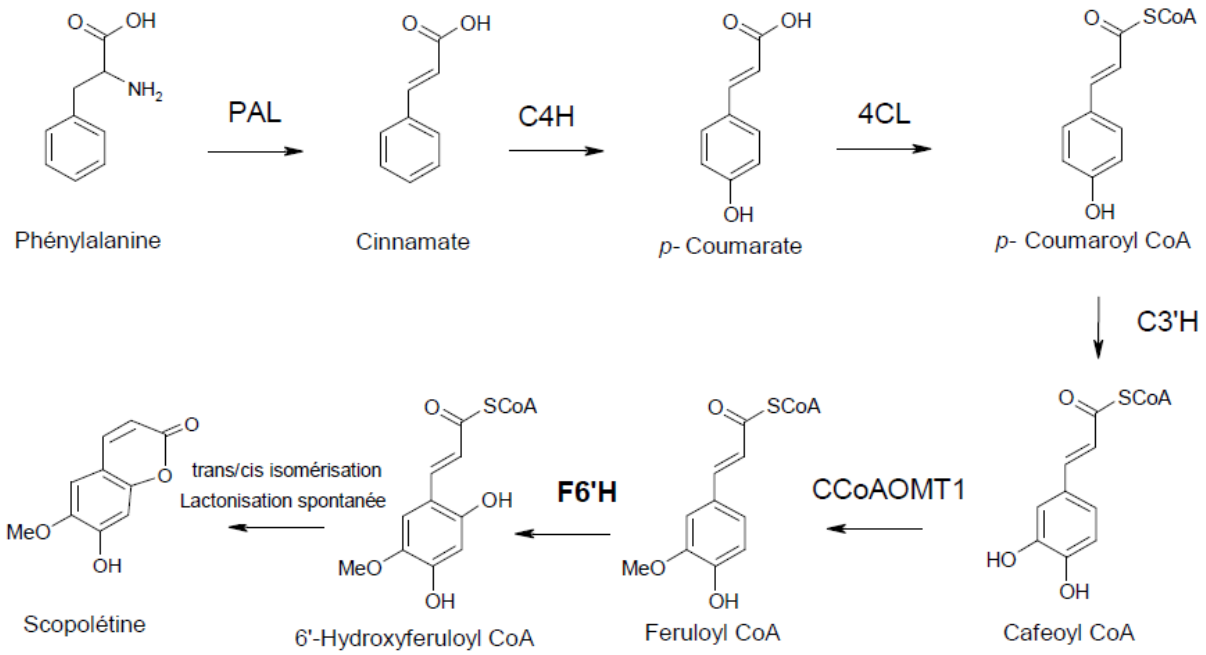
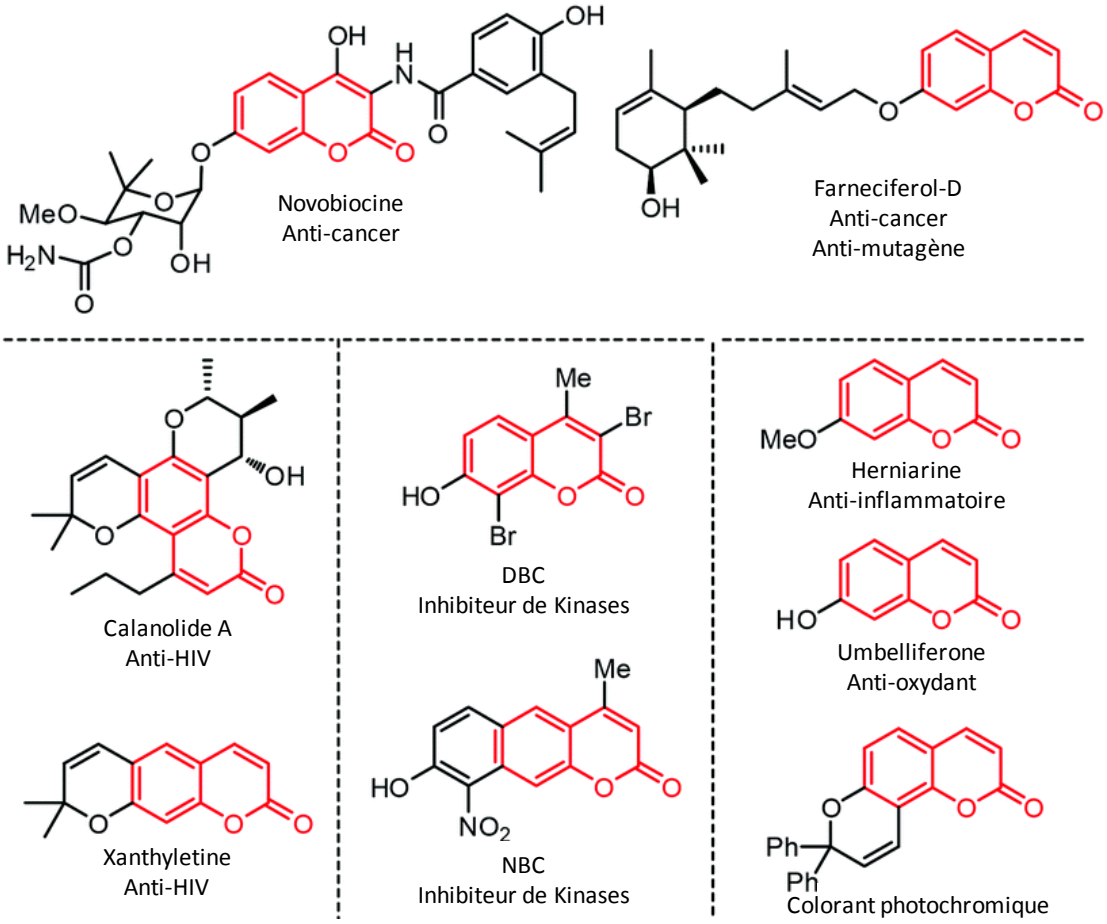


Figure 37 : Voie de biosynthèse d'une coumarine, la scopolétine, à partir de la phénylalanine.
Les trois premières étapes, communes à celles des flavonoïdes, permettent la synthèse du coumaroyl-CoA. Ce précurseur est ensuite transformé en hydroxyferuloyl-CoA sous l'action de trois enzymes. Enfin, sa cyclisation spontanée après isomérisation *trans-cis* aboutit à la production de scopolétine. Enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la scopolétine : PAL, phénylalanine amonia-lyase ; C4H, coumarate 4-hydroxylase ; 4CL, 4-coumarate CoA ligase ; C3'H, p-coumaroyl shikimate/quinate 3'-hydroxylase ; CCoAOMT1, caffeoyl CoA O-méthyltransférase ; F6'H, féruloyl CoA-6'-hydroxylase.

En général, les coumarines sont caractérisées par une grande diversité chimique (Huang, Cai et al. 2010). Cette diversité structurale est à l'origine de rôles très nombreux et variés (Figure 38) (Huang, Cai et al. 2010). Cependant, beaucoup de ces composés possèdent des activités antioxydantes et sont notamment capables de piéger l'anion superoxyde et les radicaux (Gacche, Gond et al. 2006; Kostova, Bhatia et al. 2011). Par exemple, la fraxine permet de neutraliser les radicaux libres mais également de limiter la peroxydation lipidique induite par H_2O_2 (Whang, Park et al. 2005). L'esculetine, quant à elle, est capable de piéger les EORs, particulièrement le radical hydroxyle (Kim, Kang et al. 2008). Si de nombreuses

familles de plantes sont capables de produire des coumarines, certaines sont en revanche capables de les accumuler tel le teck brésilien (*Dipteryx odorata*), l'aspérule odorante (*Galium odoratum*), la rue fétide (*Ruta graveolens*) ou le panais (*Pastinaca sativa*). Ces plantes présentent un faible niveau de prédation par les herbivores. En effet, ces composés sont tout d'abord responsables d'un goût amer et d'une suppression de l'appétit chez l'herbivore (Wang, Ridsdill-Smith et al. 2005) mais sont surtout la plupart du temps phototoxiques. Les furocoumarines sont ainsi capables de réaliser, après photoactivation par un rayonnement UV, des adduits covalents avec l'ADN, conduisant à la formation de dimère de thymine entre les deux brins d'ADN bloquant ainsi la réplication et la transcription (Dall'Acqua, Vedaldi et al. 1978; Dardalhon, de Massy et al. 1998). Les furocoumarines peuvent également se lier aux lipides et aux protéines bien que cette fonction ne soit pas encore totalement élucidée (Henegouwen, Beijersbergen et al. 1989). Au delà de la protection contre les herbivores, d'autres sont en revanche impliquées dans la protection vis-à-vis de microorganismes ou semblent permettre l'accaparation de la niche écologique par leur propriété germinicide. Par exemple, elles peuvent inhiber les cytochrome P450 monooxygénases responsables de la détoxication cellulaire chez certains organismes. Ce processus est notamment responsable chez l'Homme d'une diminution de la capacité de détoxication du foie lors d'ingestion de jus de pamplemousse riche en naringine (McCloud, Berenbaum et al. 1992; Hadacek, Muller et al. 1994) et conduire à des surdosages lors de traitements médicamenteux. Le bergaptène et la xanthotoxine présentent, quant à eux, des propriétés anti-germinatives et inhibitrices de la croissance de la laitue et de l'oignon (Stein, Alvarez et al. 2006; Brooker, Kuzimichev et al. 2007; Wang, Zhou et al. 2009). Parmi les coumarines, certaines sont de puissants cancérigènes (Figure 38). Par exemple, les aflatoxines fongiques provoquent des mutations du matériel génétique au travers d'une intercalation dans l'ADN et d'une alkylation des bases (Hudler 1998). Cependant, en physiologie humaine, de nombreux composés sont également utilisés pour leurs différentes propriétés permettant de lutter contre les infections fongiques (Montagner, de Souza et al. 2008) mais aussi de résorber les œdèmes (Casley-Smith, Morgan et al. 1993; Farinola and Piller 2005) et de traiter l'asthme (Liu 2011), le cancer (Weber, Steffen et al. 1998; Curini, Cravotto et al. 2006) et la démence (Hoerr and Noeldner 2002).



<u>Figure 38 :</u> Exemples de quelques coumarines utilisées par l'Homme et leur rôle principal associé ((Zhang, Li et al. 2014)).

Ces molécules sont principalement utilisées en médecine pour leurs propriétés respectives. Le noyau coumarine est représenté en rouge pour chaque molécule. La calanolide A, la xanthyletine et le colorant photochromique sont des pyrocoumarines de par la présence du cycle pyrane associé au cycle benzénique. La xanthyletine est une pyrocoumarine linéaire et la calanolide A et le colorant photochromique sont des pyrocoumarines angulaires. DBC, 3,8-dibromo-7-hydroxy-4-methylchromen-2-one ; NBC, 8-hydroxy-4-methyl-9-nitrobenzochromen-2-one.

Les coumarines sont également largement utilisées dans l'industrie, notamment pour leurs odeurs et leurs goûts ajoutés aux tabacs, alcools et cosmétiques. Il semble aujourd'hui que 90% des parfums contiennent des coumarines. Néanmoins, de plus en plus de pays interdisent ces composés comme additifs, voire comme médicaments, à cause de leur hépatotoxicité chez le rat. En effet, lors de la détoxication de certaines coumarines par le foie, les produits cytotoxiques engendrés présentent surtout un fort pouvoir anticoagulant. Le dicoumarol ainsi produit empêche la régénération et le recyclage de la vitamine K (Duff and Shull 1949). A titre d'exemple, la warfarine (ou coumaphène) est une molécule entrant dans la composition de nombreux raticides, en remplacement de l'arsenic, mais également dans la formulation de médicaments prévenant les thromboses (Holford 1986). Enfin, de nombreuses

études ont pu mettre en évidence que les coumarines induisent l'expression de gènes codant entre autres des GSTs mais qu'elles sont également responsables d'une diminution de l'activité de ces dernières (Kelly, Ellis et al. 2000; Lake, Evans et al. 2002). Si l'activité des monooxygénases cytochromes P450 sur les coumarines a été démontrée, celle portée par les GSTs, qu'il s'agisse de biosynthèse ou de métabolisation des coumarines, est en revanche plus indécise.

iii. Les stilbénoïdes

Les stilbénoïdes sont des phénylpropanoïdes formés par l'association de deux cycles benzéniques, liés par deux carbones, plus ou moins substitués par des fonctions alcool (Figure 39). Ces molécules se répartissent en trois classes en fonction de la nature de la liaison entre les deux cycles benzéniques. Pour les deux premières classes, les dihydrostilbénoïdes (ou bibenzyles) et les hydroxystilbènes (ou stilbènes), cette liaison est linéaire. En revanche, pour les phénanthrénoïdes, les deux carbones de la liaison forment un troisième cycle. Cette cyclisation est due à une oxydation des cycles benzéniques. Enfin, les dihydrostilbénoïdes et les stilbènes se distinguent par le niveau de saturation de la liaison linéaire reliant les cycles benzéniques. Dans le cas des stilbènes, cette liaison est insaturée. L'isomérisation photo-dépendante de cette liaison permet un changement de conformation de ces molécules. *In vivo*, seule la forme *trans* est active. Cependant, la forme *cis* de ces composés est rapidement formée lors d'une exposition aux UV. Cette réaction est irréversible et peut conduire à la cyclisation des composés pour former des phénanthrénoïdes (Figure 39).

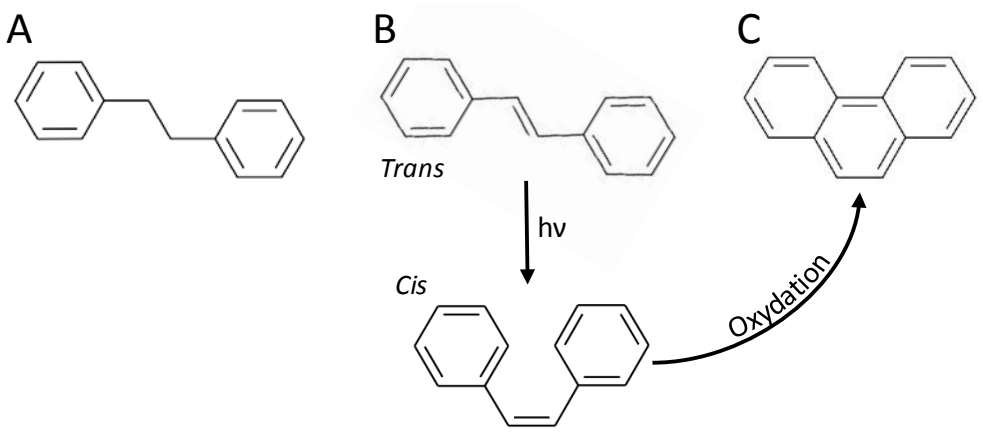


Figure 39 : Représentation des structures des trois classes de stilbénoïdes.
Les dihydrostilbénoïdes (A) et les stilbènes (B) se différencient par l'insaturation reliant les cycles benzéniques chez les stilbènes. L'isomérisation photo-dépendante des *trans*-stilbènes aboutit à la formation de composés *cis* qui par oxydation peuvent conduire à la production de phénanthrénoïdes (C). Parmi les stilbènes, seuls les composés *trans* sont actifs *in vivo*.

Tous ces métabolites secondaires sont produits par les plantes, bien que certaines bactéries semblent également capables d'en produire (Joyce, Brachmann et al. 2008). Leur voie de biosynthèse ne leur est pas spécifique mais semble commune à celle des chalconoïdes et des flavonoïdes. Ils sont produits, à l'instar de ces derniers, au travers de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes avec comme précurseurs les acides cinnamique et coumarique (Figure 40) (Sobolev, Horn et al. 2006).

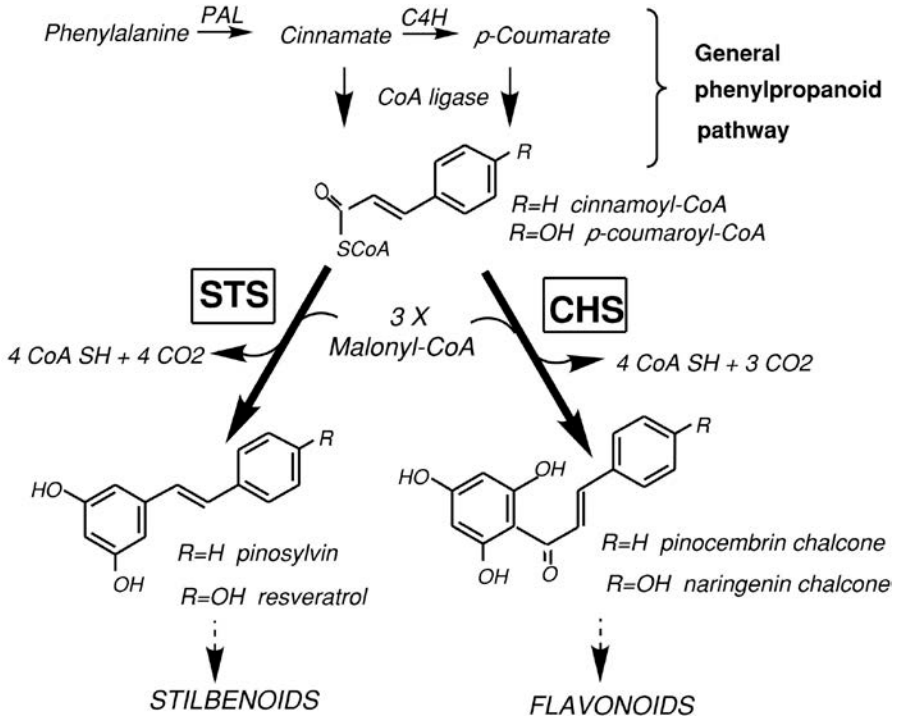


Figure 40 : Voies de biosynthèse imbriquées des stilbénoïdes et des flavonoïdes ((Kodan, Kuroda et al. 2002)).

Les voies de biosynthèse des précurseurs des stilbénoïdes et des flavonoïdes sont très similaires. Cependant, si la chalcone synthétase (CHS) utilise uniquement le coumaroyl-CoA comme substrat, la stilbène synthétase (STS) peut utiliser à la fois le coumaroyl-CoA et le cinnamoyl-CoA. *In vivo*, la production de stilbènes inhibe la production de flavonoïdes par utilisation des substrats. PAL, phénylalanine amonia-lyase ; C4H, coumarate 4-hydroxylase.

Bien que les stilbénoïdes soient présents presqu'exclusivement chez les plantes, leur répartition au sein des organismes photosynthétiques n'est cependant pas homogène. Les dihydrostilbénoïdes sont ainsi très répandus chez les végétaux inférieurs, alors qu'à l'inverse, les stilbènes sont majoritairement présents chez les plantes supérieures. Par exemples, les orchidées du genre *Dendrobium* peuvent posséder jusqu'à 20 dihydrostilbénoïdes différents au sein de leurs tissus. Au niveau fonctionnel, les stilbénoïdes sont majoritairement des phytoalexines. Leur principal rôle concerne la défense des plantes vis-à-vis de pathogènes, notamment bactériens et fongiques (Lee, Lee et al. 2005; Kovacs, Forgo et al. 2007; Kovacs,

Vasas et al. 2008; Bruneton 2009). Chez les bactéries, le 3,5-dihydroxy-4-isopropyl-*trans*-stilbene possède également des propriétés de défense du fait de ses propriétés antibiotiques. Cependant, les stilbénoïdes au sens large semblent posséder une gamme de fonctions plus vaste. Au-delà de leurs rôles de protection *in planta*, ils sont également utilisés par l'Homme pour leurs incidences sur la physiologie humaine. Par exemple, le piceatannol et l'astringine permettent non seulement de lutter contre un des virus de l'herpès (Swanson-Mungerson, Ikeda et al. 2003) mais également de diminuer l'adipogenèse de cellules en culture *in vitro* (Kwon, Seo et al. 2012). Le ptérostilbène, quant à lui, permet de limiter l'accumulation de glucose dans le sang (Pari and Satheesh 2006). Ce dernier possède également des propriétés antioxydantes importantes qui seraient responsable de son action anti-tumorale en limitant l'accumulation d'EORs (Amarnath Satheesh and Pari 2006; Mikstacka, Rimando et al. 2006). En effet, il est non seulement capable de réduire directement les EORs et les radicaux peroxydés, mais permet également de réguler l'activité d'enzymes antioxydantes telles que les SODs ou les catalases (Satheesh and Pari 2006; Perecko, Jancinova et al. 2008). Le piceatannol, l'astringine et le ptérostilbène sont des analogues de substitutions hydroxyles du resvératrol, stilbénoïde le plus étudié. Cette phytoalexine produite par les plantes en conditions de stress biotiques (Fremont 2000) possède de nombreuses propriétés (Figure 41).

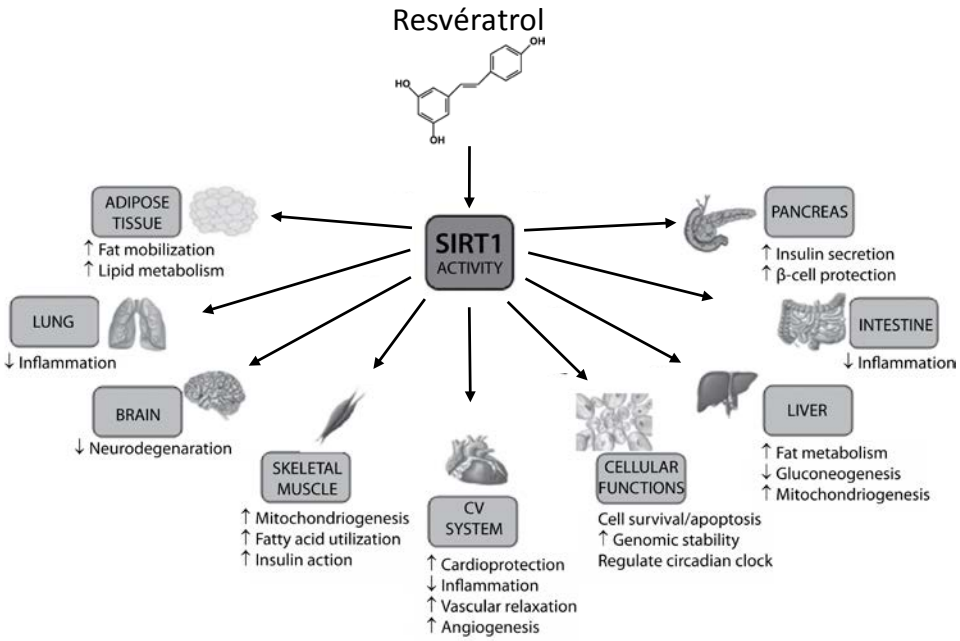


Figure 41 : Exemples de fonctions biologiques imputées au resvératrol ((Perovic, Unic et al. 2014)). Le resvératrol, par induction de l'activité de lasirtuine SIRT1 (désacétylases NAD-dépendantes), permet de réguler de nombreux processus cellulaires. Les sirtuines sont des protéines impliquées notamment dans la régulation de facteurs de transcription. CV, cardiovasculaire.

Le resvératrol, molécule aux effets controversés, permet néanmoins d'altérer la carcinogenèse et d'augmenter la production de testostérone mais aussi de réguler la formation et le métabolisme énergétique des mitochondries (Jang, Cai et al. 1997; Bhat, Lantvit et al. 2001; Schwarz and Roots 2003; Sareen, van Ginkel et al. 2006; Park, Ahmad et al. 2012; Tennen, Michishita-Kioi et al. 2012). Cependant, il demeure une molécule à pouvoir antioxydant important. Très présent dans le raisin, le resvératrol est également à l'origine du paradoxe français. S'il permet de neutraliser les radicaux libres de par sa structure et par la présence de groupements hydroxyles (Iacopini, Baldi et al. 2008), il intervient aussi dans l'augmentation de l'activité des SODs à manganèse mitochondriales et du niveau intracellulaire de glutathion. La présence de resvératrol dans les cellules permet ainsi une lutte plus efficace vis-à-vis du stress oxydant (Kode, Rajendrasozhan et al. 2008; Robb, Page et al. 2008). Les stilbénoïdes semblent donc impliqués dans la régulation redox du milieu intracellulaire, non seulement par leurs capacités intrinsèques d'antioxydants, mais également par leur possibilité d'accroître l'activité enzymatique de protéines fortement responsables de la neutralisation du stress oxydant.

3. Contrôle redox enzymatique chez les plantes

Maitriser les EORs et les variations redox intracellulaires associées constitue un challenge majeur pour les organismes. Bien que de nombreux métabolites secondaires soient capables de prendre en charge ces composés, ils ne semblent en revanche pas hautement spécialisés ni suffisants pour gérer toutes les modifications redox intracellulaires. De plus, les métabolites issus du métabolisme secondaire ne sont pas distribués équitablement entre toutes les espèces ni entre les différents tissus d'une même plante. Le développement de systèmes enzymatiques performants et ubiquitaires au cours de l'évolution s'est donc avéré essentiel pour la survie des plantes. Parmi toutes les enzymes impliquées, certaines interviennent directement dans la neutralisation des EORs, alors que d'autres participent au recyclage des molécules oxydées, ou à la régénération des enzymes de neutralisation des EORs.

a. Les catalases

Les catalases (EC 1.11.1.6) sont des enzymes ubiquitaires très performantes assurant la réduction d'H_2O_2 en H_2O et O_2. Les catalases s'organisent en homotétramères dont chaque protomère est constitué d'environ 500 acides aminés (McClung 1997). Chez Arabidopsis, ces enzymes, codées par trois gènes différents, sont peroxysomales et assurent la neutralisation du peroxyde d'hydrogène formé lors de la photorespiration (McClung 1997).

Ce tétramère permet la fixation de quatre hèmes à fer, nécessaires à l'activité de la protéine (Figure 42).

$$H_2O_2 + Fe(III)\text{-}E \longrightarrow H_2O + O\text{-}Fe(IV)\text{-}E \qquad A$$

$$H_2O_2 + O\text{-}Fe(IV)\text{-}E \longrightarrow O_2 + Fe(III)\text{-}E + H_2O \qquad B$$

$$2\,H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\,H_2O \qquad C$$

Figure 42 : Réactions catalysées par les catalases.
Le groupement hème des catalases, sous forme d'ion ferrique, permet la réduction d'une première molécule d'H_2O_2 (A). L'ion ferryle oxydé réagit avec une nouvelle molécule d'H_2O_2 (B) pour retourner sous sa forme d'ion ferrique. Le bilan réactionnel des catalases correspond à l'équation C.

Bien que leur affinité pour la molécule d'H_2O_2 soit faible (environ 25 mM), les catalases présentent une activité molaire spécifique très élevée responsable d'une efficacité catalytique très importante. En effet, les catalases sont capables de réduire plusieurs millions de molécules d'H_2O_2 par minute, ce qui en fait les enzymes les plus performantes connues. La limite de diffusion étant de 10^8 à 10^9 $M^{-1}.sec^{-1}$, les catalases, de même que les fumarases, les acétylcholinestérases et les anhydrase carboniques ont atteint le seuil virtuel de la perfection catalytique. La vitesse de réaction ne semble limitée que par la diffusion, c'est-à-dire la vitesse à laquelle le substrat arrive dans le site actif de l'enzyme. Les catalases sont donc des enzymes essentielles à la régulation des concentrations intracellulaires d'H_2O_2. En revanche, leur haute spécialisation dans cette réaction limite fortement leur capacité à réduire d'autres EORs, notamment les lipides peroxydés (Mhamdi, Noctor et al. 2012). Ces enzymes font également partie des enzymes les plus régulées lors de stress. Cependant, la régulation de leur activité dépend du type, de l'intensité et de la durée du stress. Leur activité peut ainsi être significativement augmentée pour participer plus efficacement à la détoxication cellulaire (Simova-Stoilova, Vaseva et al. 2010).

b. Les superoxyde dismutases

Les superoxyde dismutases (SOD) (EC 1.15.1.1) sont des métalloenzymes classées en fonction de la nature du métal nécessaire à leur activité. À l'instar des catalases, ces enzymes ont également atteint la perfection catalytique. Elles sont exprimées dans quasiment toutes les cellules vivantes exposées à l'oxygène et constituent une famille multigénique d'enzymes. Il existe quatre types de SODs : les SODs à cuivre et zinc, les SODs à manganèse, les SODs à fer et les SODs à nickel. Les SODs à $Cu^{2+/1+}/Zn^{2+}$ sont rencontrées chez les eucaryotes, les

SODs à $Mn^{3+/2+}$ ou $Fe^{3+/2+}$ chez les procaryotes, les mitochondries et les protistes, alors que les SODs à $Ni^{3+/2+}$ ne sont retrouvées que chez les procaryotes. Par exemple, chez Arabidopsis, les SODs sont codées par 7 gènes nucléaires différents : trois SODs à $Cu^{2+/1+}/Zn^{2+}$, trois à $Mn^{3+/2+}$ et une à $Fe^{3+/2+}$ (Kliebenstein, Monde et al. 1998). Parmi ces protéines, certaines sont exprimées dans les différents compartiments cellulaires du fait de la présence de peptides d'adressage. Les SODs ne présentent pas toutes la même organisation tridimensionnelle. Elles sont ainsi actives généralement sous forme de dimères (SODs à $Cu^{2+/1+}/Zn^{2+}$) ou de tétramères (SODs à $Mn^{3+/2+}$ et $Fe^{3+/2+}$), voire d'hexamères pour les SODs à $Ni^{3+/2+}$ (Bowler, Montagu et al. 1992; Kliebenstein, Monde et al. 1998; Barondeau, Kassmann et al. 2004). Toutes ces enzymes permettent cependant la neutralisation de l'anion superoxyde $O_2\bullet^-$ en le convertissant en H_2O_2 et O_2 au travers du couple redox de leur ion métallique ($M^{(n+1)+}/M^{n+}$) (Figure 43) (Fridovich 1986). Cette réaction semble primordiale pour les organismes photosynthétiques puisque plus de 70 % de l'isoforme chloroplastique d'Arabidopsis sont localisés, *in vivo*, sur la membrane des thylacoïdes au niveau du photosystème I. Or le PSI est le lieu majeur de production des anions superoxydes (Kitagawa, Tanaka et al. 1991; Ogawa, Kanematsu et al. 1995).

$$O_2^{\bullet -} + M^{(n+1)+}\text{-SOD} \longrightarrow O_2 + M^{n+}\text{-SOD} \qquad A$$

$$O_2^{\bullet -} + 2H^+ + M^{n+}\text{-SOD} \longrightarrow H_2O_2 + M^{(n+1)+}\text{-SOD} \qquad B$$

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad C$$

Où M = Cu (n=1) ; Mn (n=2) ; Fe (n=2) ; Ni (n=2)

Figure 43 : Réactions catalysées par les superoxyde dismutases (SOD).
Les différents groupements métalliques des superoxyde dismutases permettent à ces enzymes de catalyser, au travers du couple redox de l'ion métallique, la réduction de deux molécules d'$O_2^{\bullet -}$ (A et B). Le bilan réactionnel des superoxyde dismutases correspond à l'équation C. M, métal ; n, charge électronique du métal.

Les SODs participent donc de façon très active à la protection cellulaire vis-à-vis des dommages auto-oxydatifs. Cependant, elles sont également fortement impliquées dans la réponse aux stress biotiques ou abiotiques générant un stress oxydant (Scandalios 1993). Par exemple, lors d'un stress salin ou métallique, d'un manque d'eau ou d'exposition aux UV, l'activité de ces protéines est notamment augmentée par l'intermédiaire d'une surexpression des protéines (Drazkiewicz, Skorzynska-Polit et al. 2004; Agarwal 2007; Sharma and Dubey 2007; Regier, Streb et al. 2009; Nounjan, Nghia et al. 2012). Cette augmentation de l'activité

des SODs permet aux plantes de résister à différents types de stress (Sen Raychaudhuri and Deng 2000; Alscher, Erturk et al. 2002).

c. Les enzymes à repliement thiorédoxine

De nombreuses enzymes participant à la détoxication cellulaire possèdent une caractéristique particulière permettant de les regrouper dans une même superfamille. En effet, elles possèdent toutes un motif structural caractéristique correspondant à un repliement thiorédoxine (voir le paragraphe sur les GSTs). Ce motif de base permet en réalité des réactions d'oxydation et de réduction successives par des échanges dithiol-disulfure par l'intermédiaire de cystéines. Ces systèmes enzymatiques ont été fortement développés chez les organismes photosynthétiques et plus particulièrement les plantes terrestres. En effet, bien que ces familles de protéines présentent le même type d'activité que les orthologues présents dans d'autres types d'organismes, le nombre d'isoformes est souvent plus important chez les plantes. Par exemple, entre 3 à 6 gènes codant des thiorédoxines et glutarédoxines sont présents chez les mammifères alors qu'on compte plus de 40 isoformes pour chaque famille chez les eucaryotes photosynthétiques. Les mécanismes catalytiques et les principales fonctions de certaines protéines à repliement thiorédoxine (thiorédoxines, glutarédoxines, protéine disulfure isomérases et glutathion transférases) sont synthétisés sous la forme d'un chapitre dans le livre « *Oxidative Stress and Redox Regulation* ». Cet article, « *Redox Regulation in Plants: Glutathione and « Redoxin »Related Families* », est présenté ici. Pour cet article, j'ai participé à la rédaction de la partie traitant des GSTs.

4. **Article 1 : Redox Regulation in Plants: Glutathione and « Redoxin » Related Families**

Jean-Pierre Jacquot, Karl-Joseph Dietz, Nicolas Rouhier, Edgar Meux, Pierre-Alexandre Lallement, Benjamin Selles et Arnaud Hecker

Oxidative Stress and Redox Regulation, 2013, **Chapitre 8**, 213-231

Chapter 8
Redox Regulation in Plants: Glutathione and "Redoxin" Related Families

J.P. Jacquot, K.J. Dietz, N. Rouhier, E. Meux, P.A. Lallement, B. Selles, and A. Hecker

Abstract Photosynthetic organisms and especially terrestrial plants contain expanded redox regulatory pathways. Proteins involved in these redox chains and detoxification reactions often evolved on a thioredoxin fold structural basis. We discuss in this review the proteins associated with this superfamily, their modes of reduction/regeneration and their known protein targets, focusing in particular on the protein disulfide isomerase and glutathione transferase families. We also discuss the evolution of the redoxin and target families along the plant kingdom and provide information on the systems biology of the redox circuitry.

8.1 General Background

In general, redox reactions involve changes in the oxidoreduction state of participating compounds. Single redox reactions are combined to redox chains or pathways. In this respect, the electron transfer chain components are redox actors, with transitions at the oxidation state of metals like copper and iron for example. In this review, however, we will consider only the oxidation/reduction reactions that involve cysteine or methionine residues. In this context, the most documented redox reactions in plants concern the dithiol-disulfide exchange cascades involving components of the thioredoxin (TRX) and glutaredoxin (GRX) systems. Some

J.P. Jacquot (✉) • N. Rouhier • E. Meux • P.A. Lallement • B. Selles • A. Hecker
Interactions Arbres Microorganismes, IFR 110 EFABA, Faculté des Sciences, Unité Mixte de Recherches 1136 INRA, Université de Lorraine, Vandoeuvre Cedex, France
e-mail: j2p@univ-lorraine.fr; nrouhier@univ-lorraine.fr; edgar.meux@univ-lorraine.fr; pierre-alexandre.lallement@univ-lorraine.fr; benjamin.selles@univ-lorraine.fr; arnaud.hecker@univ-lorraine.fr

K.J. Dietz
Plant Biochemistry and Physiology, Bielefeld University, 33501 Bielefeld, Germany
e-mail: karl-josef.dietz@uni-bielefeld.de

U. Jakob and D. Reichmann (eds.), *Oxidative Stress and Redox Regulation*,
DOI 10.1007/978-94-007-5787-5_8,
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

glutathione S-transferases (GST) have the capacity to reduce disulfides in the presence of glutathione. Likewise, protein disulfide isomerases (PDI) belong to that category being able to oxidize, reduce or isomerize disulfide bonds. Besides these dithiol-disulfide exchange reactions, we will also consider those reactions, which are catalyzed by peroxiredoxins (PRX) or methionine sulfoxide reductases (MSR) and in which the redox state of catalytic cysteines varies. Overall, the changes in cysteine oxidoreduction state are essential for the catalysis of certain enzymes (e.g., formation of sulfenic acid on the catalytic cysteine of methionine sulfoxide reductases and peroxiredoxins) but they can also induce structural transitions needed to control the catalytic rates of enzymes (e.g., dithiol-disulfide control of fructose-1,6-bisphosphatase or NADP malate dehydrogenase in the chloroplasts) and of many other target proteins with diverse functions in transcription, translation, signalling and regulation.

8.2 Why Is There Redox Regulation in Plants?

It has become apparent in the last decades that redox reactions, as defined above, are particularly exacerbated in plants. For example, there are between 3 and 6 thioredoxin and glutaredoxin genes in non-photosynthetic prokaryotes and mammalian systems but about 40 genes of each family in photosynthetic eukaryotes. The PDI, MSR and PRX families are also extended but to a minor extent. The reasons for this expansion of redoxins are probably multiple. Part of it could be related to the existence of specialized tissues in plants, like the phloem and xylem for transport, epidermal and stomatal cells for leaf protection and gas exchange, stamen and pistil for reproduction etc. A more likely explanation is related to the physiology of plants. Unlike animal cells, plants contain plastids/chloroplasts, which play an essential energetic role by providing ATP and NADPH needed for CO_2 fixation. In animal cells, the energetic demands are mostly met by mitochondria, which are also present in plant cells. Chloroplasts not only fix CO_2 but they also release O_2 in a process called water photolysis at the level of photosystem II. As a result, in oxygenic photosynthetic organisms, in addition to mitochondria, NAD(P)H oxidases and peroxisomes, the chloroplast is an additional site of reactive oxygen species (ROS) generation. In plant mitochondria, ROS are generated at the level of complex I, ubiquinone and complex III (Navrot et al. 2007). In the chloroplasts, ROS are essentially generated at the level of photosystem II and photosystem I (Asada 2006). One plausible reason for the need of elevated redoxin systems in oxygenic photosynthetic organisms might therefore be related to the increased production of ROS in the light. Another specificity of plants is that unlike animal systems, they rely on light as an energy source, and this energy is converted into utilisable chemical energy by chlorophyll, a pigment specifically present in the chloroplasts. The presence of this specific additional compartment in plants has several consequences. First, for a number of reasons, it is essential to switch on selected enzymes in the light and turn them off in the dark. This could prevent futile cycles, like the one potentially

occurring between fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) and phosphofructokinase. Would such a futile cycle occur, it would induce the consumption of ATP with no net gain for the plant. Another observation is that plants lack in general efficient alternative splicing that allows in animal cells for the multiplication of isoforms from a single gene. Thus, possible explanations for the expansion in the number of genes would be first to keep "security copies" of a given gene, second to generate variants with improved selectivity or efficiency without having to rely on alternative splicing. Another relevant observation is that there is much duplication in plant genomes, which are often polyploïd. Finally the sessile lifestyle of plants requires integration of many environmental input parameters to optimize plant performance and fitness. It appears that redox cues are sensed and extensively exploited to modulate or switch developmental and acclimation processes.

8.3 Glutathione and Redoxin-Linked Pathways in Plants

Several regulatory or detoxification pathways depend on glutathione (GSH) or TRX and other thiol-linked systems in plants. In general, the proteins that have the capacity to mediate dithiol-disulfide exchange reactions (redox transmitters) possess a so-called TRX fold, namely a central pleated β sheet with 5β-strands surrounded by three or more α-helices. In TRX itself (classically about 110 amino acids), the active site with the conserved sequence WC[G/P]PC is rather surface exposed which favors the reactivity of the catalytic cysteine. Its reactivity is further enhanced by an adjacent helix dipole effect, which lowers the pKa of the thiol. In plants, TRXs are reduced either by light and the ferredoxin-thioredoxin system in plastids, or by NADPH-dependent thioredoxin reductases (NTR) in the cytosol and mitochondria. An alternative pathway in plastids consists of a fused enzyme (NtrC), composed of a NTR and a Trx module (Spínola et al. 2008). Ferredoxin thioredoxin reductase (FTR) is essentially restricted to photosynthetic organisms and is absent in mammals and non-photosynthetic organisms. This heterodimeric enzyme is uniquely shaped to accommodate on one side the substrate ferredoxin and on the other side TRX. At the interface between the two subunits of FTR lies a critical [4Fe4S] cluster and a catalytic disulfide in close proximity (Dai et al. 2007). The convergent structural evolution between FTR and NTR has been discussed in a recent review together with an exhaustive listing of the thioredoxin reductases in photosynthetic organisms (Jacquot et al. 2009). The thioredoxin structural model has given rise to a number of variants, which differ in their active site sequences, their modular organization, and/or their regeneration mechanisms. GRXs are proteins with a size similar to TRXs but with active sites that have been modified into C[P/G/S][Y/F][C/S] (class 1), CGFS (class 2), CCx[C/S] (class 3) or Cxx[C/S] (class 4) (Couturier et al. 2009). Most GRXs are reduced by the tripeptide glutathione, which itself is maintained in its reduced form via NADPH-dependent glutathione reductase. As mentioned previously, in land plants, the TRX and GRX repertoires have been greatly enhanced with about 40 genes of each category identified. TRXs, GRXs and their reducing

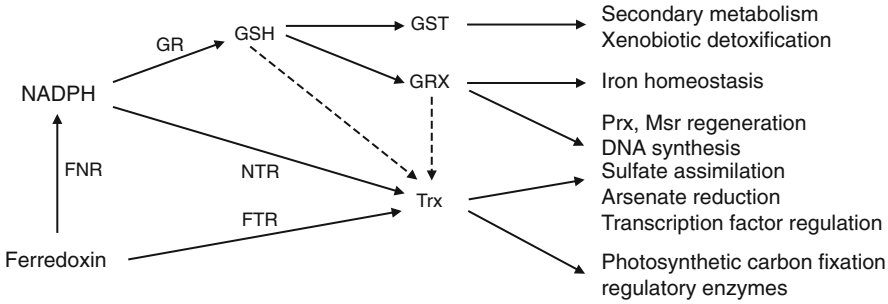


Fig. 8.1 Major functions associated with TRX and GSH/GRX reducing pathways. TRXs are usually reduced by the NADPH/NADPH-thioredoxin reductases (*NTR*) or the Ferredoxin/ferredoxin thioredoxin reductase (*FTR*) systems but a few isoforms have been shown to rely on GSH and/or GRX for their regeneration (Koh et al. 2008). GSH, maintained in its reduced form by the NADPH/glutathione reductase (*GR*) system, provides electrons to both GSTs and GRXs. FNR: ferredoxin NADP reductase

pathways have been discussed extensively in a number of recent reviews (Dietz 2003; Gelhaye et al. 2005; Rouhier et al. 2008; Chibani et al. 2009; Couturier et al. 2009; Meyer et al. 2009) and we will not detail them any further in this section. Figure 8.1 depicts the reducing systems of TRXs and GRXs in plants and some of the known functions associated to each system. The reader is invited to consult these papers and the chapter by Collet and Messens for more information on the biochemical and structural properties of these two protein families.

At least two other types of enzymes, glutathione S-transferases and protein disulfide isomerases, contain thioredoxin domains. The protein disulfide isomerases are located predominantly in the ER and the most common forms contain four thioredoxin-like modules, with an overall organization of the a-b-b′-a′ type. The a and a′ domains display CGHC active sites whereas the b and b′ modules present a TRX fold but lack the active sites. However, they are essential for some aspects of PDI activities, particularly the b′ module, which is involved in substrate recognition (Byrne et al. 2009). In the ER, the functions of PDIs are to create and isomerise disulfide bonds to ensure correct protein folding. Consequently, PDIs have both an oxidizing and reducing activity. After PDI oxidizes its protein substrates, its own disulfide bonds become reduced and need to be reoxidized. Based on results published on human and yeast proteins, different pathways apparently lead to PDI oxidation. The first candidates are the sulfhydryl oxidases Ero1 α and β flavoproteins, which catalyze the formation of disulfide bonds on PDIs with concomitant reduction of oxygen to hydrogen peroxide (Sevier and Kaiser 2008). The produced H_2O_2 can in turn be reduced by ER-located thiol-peroxidases, such as 2-Cys peroxiredoxins or glutathione peroxidases, which, once oxidized, also contribute to PDI re-oxidation (Tavender et al. 2010; Nguyen et al. 2011). Hence, the consumption of one oxygen molecule can serve to form two disulfides, allowing a tight control of ROS accumulation into the ER. Finally, it was also proposed that the proportion of oxidized glutathione, which is elevated in the ER compared to other

subcellular compartments, could be thermodynamically sufficient to reoxidize PDI active sites. It should be mentioned that these different modes of reoxidation might not equally target all PDI isoforms and that there might be specificities linked to the variety of PDI representatives, especially in photosynthetic organisms. A recent genomic analysis of PDIs in photosynthetic organisms has demonstrated that apart from the classical multimodular L-type PDI (that contains the a-b-b′-a′ modules), 8 additional PDI classes exist, which differ in their modular composition, some being monomodular, some trimodular and some others containing thioredoxin unrelated modules. Six of the PDI classes are present in terrestrial plants but three of them are restricted to algae. The detailed phylogenetic analysis can be found in Selles et al. (2011).

Another example of enzymes, which contain a TRX-like module, is glutathione-S-transferase. These enzymatic systems are often ignored although some of these enzymes possess GRX-like and peroxidase activities. For this reason, we will give a comprehensive overview of these enzymes in plants in this review. Glutathione transferases, better known as glutathione S-transferases, have been identified more than 40 years ago in rat liver (Booth et al. 1961) and in plants through their roles in the detoxification of herbicides in annual species (Lamoureux et al. 1970; Shimabukuro et al. 1971). GSTs are present in both eukaryotes and prokaryotes and constitute a multigenic superfamily that is widely distributed in nature. GSTs are the main players involved in the metabolism of electrophilic compounds within the cell. Through the addition or the substitution of a glutathione molecule (GSH, a non-ribosomally synthesized γ-Glu–Cys–Gly tripeptide) to an electrophilic center present in a small acceptor molecule, these enzymes are able to metabolize a broad range of endogenous and exogenous substrates for their detoxification, subsequent transport, export or secretion. In addition, they are also able to reduce peroxides and to recycle antioxidant molecules (ascorbate in particular) thereby providing protection against endogenous or xenobiotic substances with genotoxic and carcinogenic effects. GSTs are also involved in several other cell functions through their capacity to bind non-catalytically to a large number of endogenous and exogenous compounds.

Based on their primary sequence, 3D structure, function and cellular localization, GSTs have been initially classified into three main subfamilies: (i) the cytosolic (or soluble) GSTs, which form the largest family, (ii) the mitochondrial and peroxisomal GSTs also known as kappa GSTs, and (iii) the microsomal GSTs belonging to the superfamily of the trimeric Membrane Associated Proteins involved in Eicosanoids and Glutathione metabolism (MAPEG) (Pearson 2005). A further distinct family is represented by the plasmid-encoded bacterial Fosfomycin-resistance GSTs (FosA), a manganese-containing metalloglutathione transferase conferring resistance to the antibiotic fosfomycin (Bernat et al. 1997). The ambiguity here is that kappa GSTs are also soluble enzymes and that many GSTs included in the cytosolic/soluble class are located in organelles (nuclei, mitochondria, peroxisomes and plastids in the case of plants). Hence, although cytosolic GSTs, kappa GSTs and MAPEGs have indeed evolved separately and have to be distinguished, this classification is clearly no longer fitting (Sheehan et al. 2001).

Kappa GSTs have been discovered and characterized in both prokaryotes and eukaryotes and fulfill, in the latter, specific functions associated with mitochondria and peroxisomes, particularly in energy production and lipid metabolism, respectively (Morel and Aninat 2011). Microsomal MAPEG GSTs are enzymes, which differ substantially in size and structure from other GST families, having an average length of 150 amino acids comprising four possible membrane spanning domains and a less than 10% identity with other GST classes (Jakobsson et al. 1999, 2000; Bresell et al. 2005). In mammals, these membrane-bound trimers are involved in eicosanoid, prostaglandin and leukotriene synthesis by catalyzing GSH-dependent transferase and peroxidase reactions (Jakobsson et al. 1999).

Other GST classes initially classified as members of the cytosolic GST subfamily are present in mammals, plants, insects, parasites, fungi and bacteria. They are notably involved in primary and secondary metabolisms, and in stress response through their herbicide and xenobiotic detoxification capacities. Whereas some GST classes are found only in certain kingdoms or phyla (lambda (L), phi (F) and tau (U) in plants; delta (D), epsilon (E) in insects; beta (B) in prokaryotes, rho (R) in fishes; nu (N) in nematodes; gamma (G), etherases (GTE) and glutathione transferase (GTT) in fungi), some others are present in several kingdoms (mu (M), alpha (A), pi (P), theta (T), sigma (S), zeta (Z), omega (O), Ure2p-like as well as tetrachlorohydroquinone dehalogenase (TCHQD) and S-glutathionyl hydroquinone reductase (GHR) classes) (Table 8.1).

Although GSTs share less than 30% identity among different classes, almost all GSTs are homo- or heterodimeric enzymes with subunits of 25–35 kDa (i.e., 200–250 amino acids). Structural analyses have shown that GSTs can be divided into two domains: a highly conserved N-terminal GSH-binding domain (G-site), which is structurally similar to, and has evolved from, the TRX-fold (Atkinson and Babbitt 2009), and a less conserved C-terminal alpha-helical domain (H-site), which allows binding of a wide range of hydrophobic co-substrates (Sheehan et al. 2001). Amino acids from both domains form the catalytic site of the protein. Most typical GSTs have serine, tyrosine or cysteine as catalytic residue, but some atypical GSTs seem to use arginine or asparagine. In dehydroascorbate reductase (DHAR) and lambda GSTs, for example, the residue responsible for the enzymatic activity is a cysteine, included in a CPxA motif reminiscent of the CPxC motif found in GRXs. As a consequence, the presence of this cysteine completely changes the biochemical properties of these GSTs. Instead of promoting the formation of the reactive thiolate anion of GSH necessary for its reaction with electrophilic compounds, the presence of the cysteine provides the capability to reduce glutathionylated substrates in a manner similar to GRXs.

In plants, GSTs (encoded by 83 genes in *Populus trichocarpa* and 54 in *Arabidopsis thaliana*) can be divided into at least seven classes: theta, zeta, phi, tau, lambda, DHAR and tetrachlorohydroquinone dehalogenase (TCHQD) (Smith et al. 2004; Basantani and Srivastava 2007; Lan et al. 2009). Genes encoding GSTs are generally close to each other and grouped by class in genomes forming gene clusters. In *A. thaliana*, GSTs are divided into 34 class-specific clusters, with isolated genes representing less than 30% of the GST gene panel (Dixon et al. 2002b).

Table 8.1 Classification of GSTs

GST class	Symbol	Origin	Subunit structure	Catalytic residue
Alpha	A	Mammals	Dimer	Tyr
Beta	B	Bacteria	Dimer	Cys
Gamma	G	Fungi	Dimer	Tyr
Delta	D	Insects	Dimer	Ser
Epsilon	E	Insects	Dimer	Ser
Zeta	Z	Animals, plants and bacteria	Dimer	Ser
Theta	T	Animals, plants and bacteria	Dimer	Ser
Kappa	K	Eukaryotes and prokaryotes	Dimer	Ser
Lambda	L	Plants	Monomer	Cys
Mu	M	Mammals	Dimer	Tyr
Nu	N	Nematodes	?	Tyr
Pi	P	Mammals	Dimer	Tyr
Rho	R	Fishes	Dimer	?
Sigma	S	Animals, red and brown algae	Dimer	Tyr
Tau	U	Plants	Dimer	Ser
Phi	F	Plants	Dimer	Ser
Chi	C	Bacteria	Dimer	?
Omega	O	Mammals, fungi, insects	Dimer	Cys
DHAR	–	Plants	Monomer	Cys
GHR	–	Fungi and prokaryotes	Dimer	Cys
GTE	–	Fungi	Dimer	?
GTT	–	Fungi	Dimer	?
MAPEG	–	Eukaryotes and bacteria	Trimer	Arg
TCHQD	–	Bacteria, plants	Dimer	?
Ure2p-like	–	Fungi and bacteria	Dimer	Asn

GSTs are classified according to several criteria: (i) two GSTs belong to the same class if they share more than 40% identity, (ii) less than 25% identity separate classes in mammals, and less than 20% separate classes of GST in plants. When the percentages of identity are between 25 and 40%, other techniques are used to refine the classification such as gene structure and their number in a given species, size and position of introns and exons, immunological properties and finally enzyme activity. A few other protein families are usually classified as GSTs (EF1Bγ, MAK16, CLIC), but in general this is related to structural similarities, not to the existence of a glutathione-dependent activity. This table has been essentially constructed from the references, Pearson (2005) and Morel et al. (2009)

As an example, seven Tau GST genes are located on a fragment of 14 kb on chromosome 2 (Lin et al. 1999). In rice, less than 25% of GST genes (15 genes) are present in isolated loci in the genome. The most important cluster includes 23 Tau GSTs on a 239 kb genomic fragment of chromosome 10 (Soranzo et al. 2004). In poplar, 37 of the full-length tau GSTs and 20 tau-type fragments are arranged in six clusters (clusters I to V and VII) on five chromosomes (1, 8, 10, 11 and 19) and 4 phi GST genes constitute one cluster (cluster VI) on chromosome 14. Members of minor GST classes are sparsely distributed at single loci on different chromosomes (Lan et al. 2009). Interestingly in mammals, human alpha, mu and theta (Morel et al. 2002) and murine pi GST genes (Henderson et al. 1998) are located on specific

sections of the genome whereas delta GSTs form a single compact block of genes in insect genomes (Ding et al. 2003). The almost systematic presence of GST gene clusters in plant and animal genomes reveals common evolutionary mechanisms allowing the generation of gene redundancies.

Phi and tau GSTs are the most abundant in plants and are plant-specific. Tau GSTs catalyze conjugation reactions not only on conventional substrates but also on herbicides, such as atrazine, metolachlor, fluorodifen and thiocarbamates (Edwards and Dixon 2005). These GSTs seem to be involved in cell protection by playing a role in tolerance to environmental stress by enhancing the detoxification of herbicides (Kawahigashi 2009). Tau GSTs are also able to transfer GSH on anthocyanins, allowing their import into the vacuole by ABC transporters (Edwards et al. 2000). Members of the phi class have peroxidase and transferase activity, notably on herbicides (Marrs 1996). In addition, expression of phi GSTs is induced in response to auxin. Interestingly, AtGSTF2, the best-studied Phi GST of *A. thaliana*, is strongly induced by oxidative stress and phytohormone treatment and it is able to bind auxin non-enzymatically. Thus, this protein is involved not only in response to stress, but also in growth and development (Gong et al. 2005; Smith et al. 2003). A GST class present both in plants and animal systems is the theta class. Theta GSTs function as GSH-dependent peroxidases using glutathione to reduce organic hydroperoxides into the corresponding alcohols during oxidative stress (Frova 2003). Zeta GSTs, highly conserved GSTs in eukaryotes, act as GSH-dependent isomerases in the catabolism of tyrosine by catalyzing the isomerization of maleylacetoacetate to fumarylacetoacetate (Dixon et al. 2000). In contrast, lambda and DHAR classes show neither transferase nor peroxidase activity but exhibit GRX-like activities through their capacity to reduce disulfides (hydroxyethyldisulfide) and dehydroascorbate using, as described below, a conserved reactive cysteinyl residue. Thus, like GRXs, they might be involved in the maintenance of the cellular redox balance (Dixon et al. 2002a). The ability of GSTs to bind a large range of small molecules led to hypothesize that these enzymes could be involved in various metabolic pathways. Supporting this view, *Arabidopsis* lambda GSTs were recently shown to bind S-glutathionylated flavonols, porphyrins or tocopherols (Dixon and Edwards 2010; Mueller et al. 2000; Dixon et al. 2011). However, their exact functions *in planta* remain unknown, mostly because the study of knock-out mutants is complex considering the existence of multigenic families. TCHQD, initially discovered in the soil bacterium *Sphingobium chlorophenolicum*, which can grow on pentachlorophenol as carbon source, are found in animals, terrestrial plants and bacteria. In *S. chlorophenolicum*, TCHQD catalyses the reductive dehalogenation of tetrachlorohydroquinone to trichlorohydroquinone and then to 2,6-dichlorohydroquinone during the biodegradation of pentachlorophenol (Xun et al. 1992), an environmental xenobiotic used as fungicide for wood preservation. Members of the TCHQD class, which are closely related to zeta class, present an unusual ability to metabolize chlorinated xenobiotics. Finally, plants also possess members with similarities to microsomal MAPEG or prostaglandin E synthase families, but their function and properties have not been explored to date.

8.4 Thioredoxin Targets

A number of plant thioredoxin targets are extremely well described both in terms of physiology and structure/function. Most of these redox-regulated target enzymes are involved in carbon fixation and metabolism, and are located in plastids (Jacquot et al. 1997). Interestingly, many of these enzymes (e.g., NADP-malate dehydrogenase, fructose-1,6-bisphosphatase, CF1 ATPase) have non-regulatory counterparts in other subcellular compartments. Sequence comparisons have led to the identification of redox regulatory elements that contain critical cysteine residues (Schürmann and Jacquot 2000). These elements vary from one enzyme model to another, both in their position (sometimes as N- or C-terminal extensions, sometimes as insertions), their length (generally between 5 and 30 amino acids) and their amino acid sequence. The multiplication of known regulatory sequences and structures of redox-regulated enzymes led to the following concept: there is no "magic regulatory module" for redox control in enzymes. In fact, some of these enzymes do not even contain sequence insertions or additions but simply harbor cysteine residues that have been introduced at critical positions in their sequence. It appears that the amino acid sequence evolution of each enzyme responds to structural constraints specific for each individual case. 3D-structures have revealed at least for two of these enzymes (NADP-MDH and FBPase) that the regulatory disulfides are distant from the active site and that large molecular movements are needed to open the active sites in order for catalysis to proceed (Ruelland and Miginiac-Maslow 1999). As a consequence, these enzymes are reduced quickly via the FTR system but their catalytic activity appears on a much slower time scale. This property, linked to the additional observation that the rate of reduction is much slower than the rate of catalysis in these enzymes, classifies them as hysteretic enzymes (Hertig and Wolosiuk 1983). Of significant interest is the observation that redox regulation has been acquired along with the evolution of the green lineage and especially together with the onset of oxygenic photosynthesis. One very interesting example is NADP-MDH. In terrestrial plants, each of the two subunits of the homodimeric enzyme has amino acid extensions at both N- and C-terminus, each containing two regulatory cysteines (overall the dimeric enzyme contains four disulfide bonds in its oxidized, inactive state). In the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, however, the enzyme lacks the N-terminal disulfide but contains the C-terminal disulfide and is hence less tightly redox controlled. The *Chlamydomonas* NADP-MDH has been proposed to represent an evolutionary step leading to the terrestrial plant model, where full redox control has been achieved with the subsequent addition of the N-terminal disulfide (Lemaire et al. 2005). Other well-recognized targets of thioredoxins in plants participate in the detoxification of peroxides or repair of their molecular damages. PRXs are thiol peroxidases that are present in various plant cell compartments and detoxify a broad range of peroxides into alcohol, whereas methionine sulfoxide reductases are enzymes catalyzing the reduction of methionine sulfoxide into methionine. Atypical type II PRX, 2 Cys PRX, PRX Q and MSRA are all regenerated by TRXs (Rouhier et al. 2002, 2004,

2007). Interestingly, so-called glutathione peroxidases lack selenocysteines in plants and they are in fact thioredoxin-dependent enzymes (Navrot et al. 2006). A large number of additional thioredoxin targets have been identified by various methods, but principally by fishing them using TRX variants, in which the second cysteine of the active site has been substituted by site-directed mutagenesis into serine. These TRX engineered variants attack proteins with disulfides but cannot release their substrates. Client proteins are then dissociated with dithiothreitol and analyzed with proteomics techniques. This approach has led to the discovery of hundreds of putative targets involved in many different physiological pathways (Balmer et al. 2003, 2004; Montrichard et al. 2009). Some of these target enzymes have been confirmed biochemically but for many of them experimental confirmation is still lacking. A comforting observation is that a large number of these sequences contain conserved cysteines, which could potentially be involved in regulatory sites.

8.5 Glutaredoxin Targets

The first glutaredoxin-linked enzymatic system recorded is probably the ribonucleotide reductase in *E. coli*, and in fact GRX was discovered in a *trx* mutant strain still able to reduce ribonucleotides into deoxyribonucleotides (Holmgren 1976). It is likely that GRXs play a similar role in plants but there is not much evidence about it yet. A second enzymatic system linked to GRX is involved in sulphur assimilation. In terrestrial plants, the step generating reduced sulfide from adenosine phosphosulfate is catalysed by APS reductase. Higher plant APS reductases contain a built-in GRX module located at the C-terminus of the polypeptide (Bick et al. 1998). Glutaredoxin was then identified as a good electron donor to atypical type II PRXs (Rouhier et al. 2001, 2002). Interestingly, it was later found that *prx* and *grx* genes are fused in several pathogenic bacteria and cyanobacteria lending further support to this proposal (Rouhier and Jacquot 2003). GRX was also demonstrated to be a preferred electron donor to a specific subclass of B-type methionine sulfoxide reductases (Tarrago et al. 2009). Besides those "direct" biochemical observations, the need for GRX was also evaluated using a strategy similar to the one employed with TRXs, i.e. generation of GRX variants containing a single active site cysteine, formation of a stable disulfide between GRX and its targets, release of the target proteins with a reductant and identification of target proteins by mass spectrometry. This has led to the identification of nearly 100 potential targets, some of them being redundant with TRX but some others specific to GRX. This work confirmed PRXs as possible targets and also that β-carbonic anhydrase was indeed redox-regulated via GRX *in vitro* (Rouhier et al. 2005). Recent advances have indicated that in addition to their redox role, plant glutaredoxins especially of the CGFS type are involved in iron sulphur cluster assembly and iron homeostasis. We have not detailed these exciting developments in this chapter as they are included in the paper by Messens et al. in this volume. More details can also be obtained in recent reviews published by Rouhier et al. (2008) and Rouhier et al. (2010).

8.6 Evolution of the Redox Systems in Photosynthetic Organisms

Genome comparisons allow the identification of orthologous and paralogous genes and to construct robust phylogenetic relationships. This approach has been used extensively to identify and categorize components of plant redox systems. It became clear that the number of gene family members of redox proteins in plants usually exceeds the one found in non-photosynthetic multicellular organisms as impressively demonstrated when comparing TRX and GRX diversification in plants and humans. Thus, mammalian genomes code for two dithiol GRXs (Grx1 and 2) and two monothiol GRXs (Grx3 and Grx5) while 33 gene loci coding for GRXs and GRX domain-containing proteins have been identified in *A. thaliana* (Couturier et al. 2009). The largest expansion of GRX occurred in the CC-type GRX subfamily, which took over specific functions in developmental control and interact with transcription factors (Ziemann et al. 2009). Likewise 44 open reading frames for TRXs and TRX-like proteins in *A. thaliana* compare with two human TRXs. Regarding peroxiredoxins, a detailed comparison of the fully annotated genomes of *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Chlamydomonas reinhardtii* and the cyanobacterium *Synechocystis PPC6803* allows us to define the minimum PRX inventory in plants and green alga (Table 8.2). Thus, plastids contain at least one 2-Cys PRX, one PRX Q and one type II PRX named PRX IIE. One 1-Cys PRX localizes to the higher plant nucleus and cytosol, the PRX IIF to the mitochondrion and another type II PRX to the cytosol (Dietz 2011). Thus 7–10 *prx* genes in higher plant genomes compare with 6 *prx* genes in humans. In contrast to some animal glutathione peroxidases (GPXs), plant GPXs do not employ a selenocysteine in their catalytic peroxidatic site but, like PRXs, use a Cys residue instead. Plant GPXs are localized in plastids, mitochondria, cytosol and the secretory pathway (Navrot et al. 2006). After each peroxide reduction reaction, PRXs and GPXs are oxidized and need to be regenerated by thiol-dependent electron donors such as GRX or TRX. Usually there is specificity or at least strong preference for specific electron donors, although type II PRXs generally accept electrons from both GRXs and TRXs (Rouhier et al. 2001). In conclusion, the present knowledge suggests that redox systems in plants have evolved to particular complexity, which is linked to the multiplicity of stress factors that act on sessile land plants during their life cycle.

8.7 Systems Biology of the Redox Regulatory Circuits

The thiol/disulfide redox system of the cell can be considered as a network of components linked by electron flow. In its central part, thiol/disulfide exchange reactions take place in a cascade like arrangement (Fig. 8.2). The thiol/disulfide network is connected to other redox reactions in metabolism, such as to photosynthetic

Table 8.2 Compilation of gene families encoding GRX, TRX, PRX, GPX and SRX in *Synechocystis pcc6803*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* and *Oryza sativa*

Gene families		*S. pcc6803*		*C. reinhardtii*		*A. thaliana*		*P. trichocarpa*		*O. sativa*	
PRX	2-CysPrx	5	1	7	2 + 1[a]	9	2	9	2	7	1
	1-CysPrx		1		–	10[b]	1		1		1
	PrxIIB		–		1		3		2		1
	PrxIIE		1		1		(+1)		1		2
	PrxIIF		–		1		1		1		1
	PrxQ		2		1		1		2		1
GPX	Cys	2	2	5	3	8	8	6	6	5	5
	SeCys		–		2		–		–		
SRX				1		1		1		1	
TRX	Trx-f	4		10	2	44	2	44[c]	1	30[d]	
	Trx-m		1		1		4		8		
	Trx-x		1		1		1		1		
	Trx-y		1		1		2		2		
	Trx-z				1		1		1		
	Trx-h				2		8		7		
	Trx-o				1		2		1		
	Others		1		2		24		23		
GRX[e]	Class I (CPY/FC)	3[f]	2	7	2	33	6	38	6	29	5
	Class II (CGFS)		1		4		4		5		5
	Class III (CCxx)				1		21		24		17
	Class IV						2		3		2

[a]The *C. reinhardtii* genome codes for a fusion protein consisting of 2-CysPRX and TRX domains (Dayer et al. 2008)
[b]PrxIIA appears to be a non functional gene (Dietz 2011)
[c]Chibani et al. (2009)
[d]Nuruzzaman et al. (2008); the TRX assignment in *O. saliva* to subfamilies is still incomplete
[e]Ziemann et al. (2009)
[f]Marteyn et al. (2009). The numbers in the first column assigned to each organism give the total sum of family members, and the numbers in the second column depict the numbers of each isoform within the family

electron transport by means of electron input elements (Dietz and Pfannschmidt 2011). Redox transmitters, as described before, mediate electron transfer to redox target proteins. Ultimately the electrons are passed on to electron acceptors such as reactive oxygen species and reactive nitrogen species. During oxidative stress when ROS and RNS accumulate to high levels, they may directly react with some regulatory targets converting them into oxidized disulfide, sulfenylated, sulfinylated, sulfonylated, nitrosylated, nitrated or glutathionylated forms (Jacob and Anwar 2008). However, during regular metabolism, most ROS and RNS are safely detoxified minimizing uncontrolled redox reaction. This role is achieved

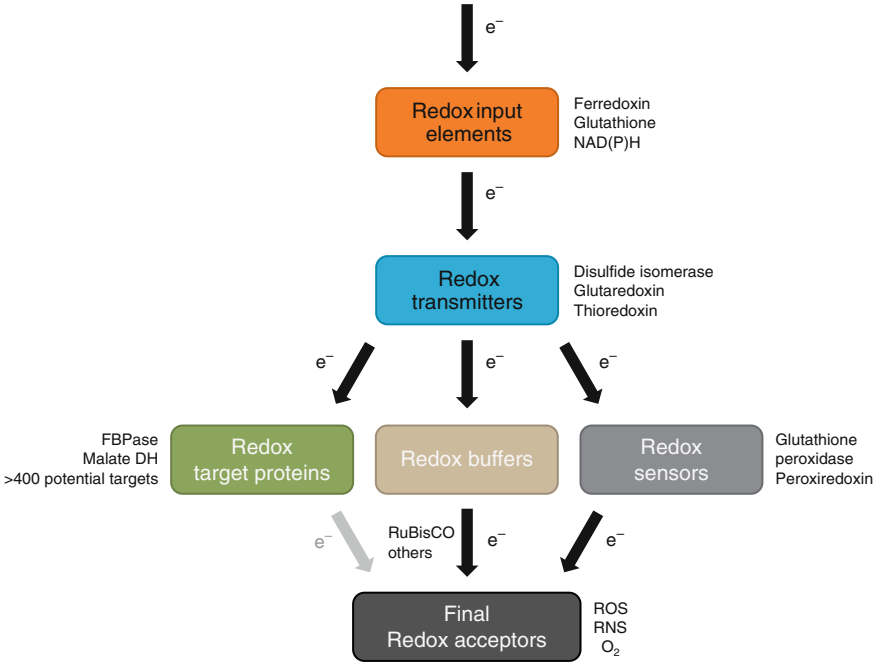


Fig. 8.2 Simplified schematics of the principle structure of the redox regulatory network of the cell. Redox input elements, transmitters, target proteins, sensors, buffers and ROS and RNS constitute a thiol/disulfide redox regulatory network that controls essentially all aspects of metabolism and development. Examples for each type of component are indicated

by the antioxidant systems of the cell. PRXs and GPXs are both antioxidants and elements of the thiol/disulfide network. Therefore, they function as redox sensors, reducing peroxides and withdrawing electrons from the thiol-based redox transmitters, thereby assisting the system to adjust to the prevailing redox condition of the cell. During more severe oxidative conditions, ROS and RNS not only react with protein thiols of these sensors or of less preferred regulated target proteins but also with other protein thiols that likely buffer ROS bursts. Thus, the concept of redox input elements, transmitters, targets, sensors and final electron acceptors, needs to be extended to redox buffer proteins (Fig. 8.2). Proteomics approaches have identified more than 400 potential thiol-oxidation targets in plants (Lindahl and Kieselbach 2009). The distinction between regulatory targets and redox buffer proteins is often difficult, as illustrated by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO). With its stromal concentration of 0.5 mmol/L and 8 large and 8 small subunits with 9 + 4 Cys residues in *A. thaliana*, RubisCO represents the largest thiol pool of any compound in the chloroplast. Moreno et al. (2008) titrated RubisCO with redox reagents and observed two effects; moderate oxidation inhibited RubisCO carboxylation activity while strong oxidation triggered proteolysis. The increasing wealth of information on plant redox regulation and

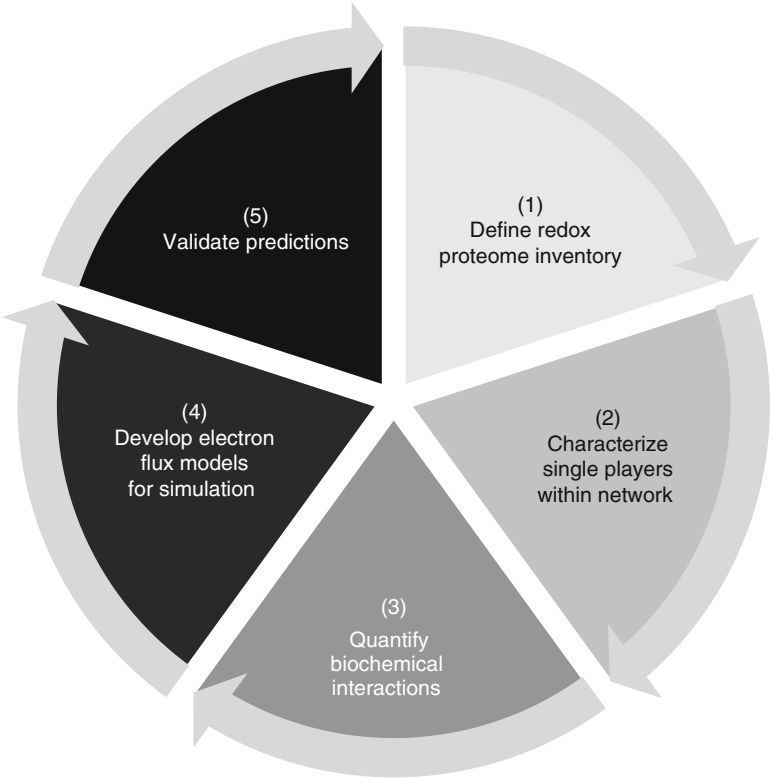


Fig. 8.3 Systems biology approach needed for complete understanding of the thiol/disulfide redox regulatory network (see text for details)

its unique complexity, calls for the next step in analytical pervasion. Figure 8.3 depicts the work flow of a typical systems biology approach, applied to redox biology (in this respect, theoretical and practical concepts concerning hubs and bottlenecks in signalling networks can be found in a recent review by Dietz et al. in 2010). As pointed out above, the basic inventory of participating proteins but also first sets of qualitative and quantitative interactions are available as well as genetic approaches for functional validation. In each work module, additional experimental efforts are still needed, for instance to identify less abundant thiol/dithiol transition proteins and to deepen our quantitative understanding on interactions. In addition, the development of descriptive qualitative and quantitative models for simulation and prediction are needed to understand the competition for electrons and the functionality of feedback and feed forward regulation achieved through the redox network. First models on H_2O_2 reduction by the ascorbate-dependent water-water cycle have been developed by Polle (2001) and were combined with photosynthesis by Laisk et al. (2006). However these models do not include the thiol-disulfide network as central controlling mechanism. Adimora et al. (2010) constructed a

predictive model of the rat liver cell thiol system and analyzed steady-state fluxes. The simulation indicates an unequal flux through the thioredoxin-dependent and glutathione-dependent antioxidant pathways. In human cells, TRX is predicted to bear the major antioxidant defense load due to the function of peroxiredoxins and protein disulfide oxidation and their regeneration (Adimora et al. 2010). Similar attempts are needed for photosynthesizing cells.

8.8 Concluding Remarks

A nagging question remains in photosynthetic organisms: why are there so many TRX and GRX isoforms and what about their possible redundancy? We have given a number of arguments in this paper that provide possible answers to this question but many are awaiting experimental confirmation. The questions are of course difficult to answer because of the complexity of the redox network but also because genetic tools for gene knockout are lagging behind in land plants compared to yeast. In this respect, photosynthetic bacterial models such as *Synechocystis* are of interest. Another possibility would be to use *Physcomitrella patens*, a moss in which gene knockout is much more feasible. Of course high throughput gene sequencing will also help us compare the redoxin equipment along the evolution of the green lineage and we will certainly obtain useful information by comparing the photosynthetic genomes in the future. Finally, comparing redox regulation networks in perennial photosynthetic organisms (*e.g.*, trees) *versus* annual species will also be of interest, and comparing the poplar and *Arabidopsis* models is certainly a first step in this direction.

References

Adimora NJ, Jones DP, Kemp ML (2010) A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. Antioxid Redox Signal 13:731–743

Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiol 141:391–396

Atkinson HJ, Babbitt PC (2009) Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. Biochemistry 48:11108–11116

Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schürmann P, Buchanan BB (2003) Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. Proc Natl Acad Sci USA 100:370–375

Balmer Y, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP, Manieri W, Schürmann P, Droux M, Buchanan BB (2004) Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA 101:2642–2647

Basantani M, Srivastava A (2007) Plant glutathione transferases – a decade falls short. Can J Bot 85:443–456

Bernat BA, Laughlin LT, Armstrong RN (1997) Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. Biochemistry 36:3050–3055

Bick JA, Aslund F, Chen Y, Leustek T (1998) Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5′-adenylylsulfate reductase. Proc Natl Acad Sci USA 95:8404–8409

Booth J, Boyland E, Sims P (1961) An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. Biochem J 79:516–524

Bresell A, Weinander R, Lundqvist G, Raza H, Shimoji M, Sun TH, Balk L, Wiklund R, Eriksson J, Jansson C, Persson B, Jakobsson PJ, Morgenstern R (2005) Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. FEBS J 272:1688–1703

Byrne LJ, Sidhu A, Wallis AK, Ruddock LW, Freedman RB, Howard MJ, Williamson RA (2009) Mapping of the ligand-binding site on the b′ domain of human PDI: interaction with peptide ligands and the x-linker region. Biochem J 423:209–217

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

Couturier C, Jacquot JP, Rouhier N (2009) Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. Cell Mol Life Sci 66:2539–2545

Dai S, Friemann R, Glauser DA, Bourquin F, Manieri W, Schürmann P, Eklund H (2007) Structural snapshots along the reaction pathway of ferredoxin-thioredoxin reductase. Nature 448:92–96

Dayer R, Fischert BB, Eggen RIL, Lemaire SD (2008) The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*. Genetics 179:41–57

Dietz KJ (2003) Plant peroxiredoxins. Annu Rev Plant Biol 54:93–107

Dietz KJ (2011) Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. Antioxid Redox Signal 15:1129–1159

Dietz KJ, Pfannschmidt T (2011) Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. Plant Physiol 155:1477–1485

Dietz KJ, Jacquot JP, Harris GC (2010) Tansley review: hubs and bottlenecks in plant molecular signalling networks. New Phytol 188:919–938

Ding YC, Ortelli F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H (2003) The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. BMC Genomics 4:35

Dixon DP, 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

Dixon DP, Cole DJ, Edwards R (2000) Characterisation of a zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism. Arch Biochem Biophys 384:407–412

Dixon DP, Davis BG, Edwards R (2002a) Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 277:30859–30869

Dixon DP, Lapthorn A, Edwards R (2002b) Plant glutathione transferases. Genome Biol 3:1–10, REVIEWS 3004.1–3004.10

Dixon DP, Steel PG, Edwards R (2011) Roles for glutathione transferases in antioxidant recycling. Plant Signal Behav 6:1223–1227

Edwards R, Dixon DP (2005) Plant glutathione transferases. Methods Enzymol 401:169–186

Edwards R, Dixon DP, Walbot V (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. Trends in Plant Science 5:193–198

Frova C (2003) The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. Physiol Plant 119:469–479

Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP (2005) The plant thioredoxin system. Cell Mol Life Sci 62:24–35

Gong H, Jiao Y, Hu WW, Pua EC (2005) Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development in vivo and shoot morphogenesis *in vitro*. Plant Mol Biol 57: 53–66

Henderson CJ, Smith AG, Ure J, Brown K, Bacon EJ, Wolf CR (1998) Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. Proc Natl Acad Sci USA 95:5275–5280

Hertig CM, Wolosiuk RA (1983) Studies on the hysteretic properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. J Biol Chem 258:984–989

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

Jacob C, Anwar A (2008) The chemistry behind redox regulation with a focus on sulphur redox systems. Physiol Plant 133:469–480

Jacquot JP, Lancelin JM, Meyer Y (1997) Tansley review n° 94: thioredoxins: structure and function in plant cells. New Phytol 136:543–570

Jacquot JP, Eklund H, Rouhier N, Schürmann P (2009) Structural and evolutionary aspects of thioredoxin reductases in photosynthetic organisms. Trends Plant Sci 14:336–3343

Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B (1999) Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. Protein Sci 8:689–692

Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B (2000) Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. Am J Respir Crit Care Med 161:S20–S24

Kawahigashi H (2009) Transgenic plants for phytoremediation of herbicides. Curr Opin Biotechnol 20:225–230

Koh CS, Navrot N, Didierjean C, Rouhier N, Hirasawa M, Knaff DB, Wingsle G, Samian R, Jacquot JP, Corbier C, Gelhaye E (2008) An atypical catalytic mechanism involving three cysteines of thioredoxin. J Biol Chem 283:23062–23072

Laisk A, Eichelmann H, Oja V (2006) C_3 photosynthesis *in silico*. Photosynth Res 90:45–66

Lamoureux GL, Shimabukuro RH, Swanson HR, Frear DS (1970) Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections. J Agric Food Chem 18:81–86

Lan T, Yang ZL, Yang X, Liu YJ, Wang XR, Zeng QY (2009) Extensive functional diversification of the populus glutathione S-transferase supergene family. Plant Cell 21:3749–3766

Lemaire SD, Quesada A, Merchan F, Corral JM, Igeno MI, Keryer E, Issakidis-Bourguet E, Hirasawa M, Knaff DB, Miginiac-Maslow M (2005) NADP-malate dehydrogenase from unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. A first step toward redox regulation? Plant Physiol 137:514–521

Lin X, Kaul S, Rounsley S, Shea TP, Benito MI, Town CD, Fujii CY, Mason T, Bowman CL, Barnstead M, Feldblyum TV, Buell CR, Ketchum KA, Lee J, Ronning CM, Koo HL, Moffat KS, Cronin LA, Shen M, Pai G, Van Aken S, Umayam L, Tallon LJ, Gill JE, Adams MD, Carrera AJ, Creasy TH, Goodman HM, Somerville CR, Copenhaver GP, Preuss D, Nierman WC, White O, Eisen JA, Salzberg S, Fraser CM, Venter JC (1999) Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 402:761–768

Lindahl M, Kieselbach T (2009) Disulphide proteomes and interactions with thioredoxin on the track towards understanding redox regulation in chloroplasts and cyanobacteria. J Proteomics 72:416–438

Marrs KA (1996) The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47:127–158

Marteyn B, Domain F, Legrain P, Chauvat F, Cassier-Chauvat C (2009) The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in *Synechocystis* PCC6803. Mol Microbiol 71:520–532

Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F, Reichheld JP (2009) Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. Annu Rev Genet 43:335–367

Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. J Proteomics 72:452–474

Morel F, Aninat C (2011) The glutathione transferase kappa family. Drug Metab Rev 43:281–291

Morel F, Rauch C, Coles B, Le Ferrec E, Guillouzo A (2002) The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. Pharmacogenetics 12:277–286

Morel M, Ngadin AA, Droux M, Jacquot JP, Gelhaye E (2009) The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Cell Mol Life Sci 66:3711–3725

Moreno J, García-Murria MJ, Marín-Navarro J (2008) Redox modulation of Rubisco conformation and activity through its cysteine residues. J Exp Bot 59:1605–1614

Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V (2000) AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. Plant Physiol 123: 1561–1570

Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP, Routhier N (2006) Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. Plant Physiol 142:1364–1379

Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP (2007) ROS generation and antioxidant systems in plant mitochondria. Physiol Plant 129:185–195

Nguyen VD, Saaranen MJ, Karala AR, Lappi AK, Wang L, Raykhel IB, Alanen HI, Salo KE, Wang CC, Ruddock LW (2011) Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. J Mol Biol 406:503–515

Nuruzzaman M, Gupta M, Zhang CJ, Wang L, Xie WB, Xiong LH, Zhang QF, Lian XM (2008) Sequence and expression analysis of the thioredoxin protein gene family in rice. Mol Genet Genom 280:139–151

Pearson WR (2005) Phylogenies of glutathione transferase families. Methods Enzymol 401: 186–204

Polle A (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. Plant Physiol 126:445–462

Rouhier N, Jacquot JP (2003) Molecular and catalytic properties of a peroxiredoxin-glutaredoxin hybrid from *Neisseria meningitidis*. FEBS Lett 554:149–153

Rouhier N, Gelhaye E, Sautiere PE, Brun A, Laurent P, Tagu D, Gerard J, de Faÿ E, Meyer Y, Jacquot JP (2001) Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. Plant Physiol 127:1299–1309

Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP (2002) Glutaredoxin dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. J Biol Chem 277:13609–13614

Rouhier N, Gelhaye E, Gualberto JM, Jordy MN, De Fay E, Hirasawa M, Duplessis S, Lemaire SD, Frey P, Martin F, Manieri W, Knaff DB, Jacquot JP (2004) Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. Plant Physiol 134:1027–1038

Rouhier N, Villarejo A, Srivastava M, Gelhaye E, Keech O, Droux M, Finkemeier I, Samuelsson G, Dietz KJ, Jacquot JP, Wingsle G (2005) Identification of plant glutaredoxin targets. Antioxid Redox Signal 7:919–929

Rouhier N, Kauffmann B, Tete-Favier F, Paladino P, Gans P, Branlant G, Jacquot JP, Boschi-Muller S (2007) Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type A methionine sulfoxide reductases. J Biol Chem 282:3367–3378

Rouhier N, Lemaire S, Jacquot JP (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. Annu Rev Plant Biol 59:143–166

Rouhier N, Couturier J, Jacquot JP, Johnson MK (2010) Glutaredoxins and iron homeostasis. Trends Biochem Sci 35:43–52

Ruelland E, Miginiac-Maslow M (1999) Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? Trends Plant Sci 4:136–141

Schürmann P, Jacquot JP (2000) Plant Thioredoxin systems revisited. Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol 51:371–400

Selles B, Jacquot JP, Rouhier N (2011) Comparative genomic study of protein disulfide isomerases from photosynthetic organisms. Genomics 97:37–50

Sevier CS, Kaiser CA (2008) Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. Biochim Biophys Acta 1783:549–556

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem J 360:1–16

Shimabukuro RH, Frear DS, Swanson HR, Walsh WC (1971) Glutathione conjugation. An enzymatic basis for atrazine resistance in corn. Plant Physiol 47:10–14

Smith AP, Nourizadeh SD, Peer WA, Xu J, Bandyopadhyay A, Murphy AS, Goldsbrough PB (2003) Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. Plant J 36:433–442

Smith AP, DeRidder BP, Guo WJ, Seeley EH, Regnier FE, Goldsbrough PB (2004) Proteomic analysis of Arabidopsis glutathione S-transferases from benoxacor- and copper-treated seedlings. J Biol Chem 279:26098–26104

Soranzo N, Gorla MS, Mizzi L, De Toma G, Frova C (2004) Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. Mol Genet Genomics 271:511–521

Spínola MC, Pérez-Ruiz JM, Pulido P, Kirchsteiger K, Guinea M, González M, Cejudo FJ (2008) NTRC new ways of using NADPH in the chloroplast. Physiol Plant 133:516–524

Tarrago L, Laugier E, Zaffagnini M, Marchand C, Le Maréchal P, Rouhier N, Lemaire SD, Rey P (2009) Regeneration mechanisms of *Arabidopsis thaliana* methionine sulfoxide reductases B by glutaredoxins and thioredoxins. J Biol Chem 284:18963–18971

Tavender TJ, Springate JJ, Bulleid NJ (2010) Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum. EMBO J 15:4185–4197

Xun L, Topp E, Orser CS (1992) Purification and characterization of a tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase from a *Flavobacterium sp*. J Bacteriol 174:8003–8007

Ziemann M, Bhave M, Zachgo S (2009) Origin and diversification of land plant CC-type glutaredoxins. Genome Biol Evol 1:265–277

Les glutathion S-transférases

1. Historique

L'activité de conjugaison des glutathion transférases a été mise en évidence et décrite pour la première fois en 1961 dans des extraits de foie de rat. Sans identifier de façon précise ces protéines, les auteurs ont montré qu'une modification enzymatique liée à la présence de glutathion permettait de diminuer la toxicité cellulaire de composés aromatiques halogénés, tels que la sulfobromophtaléine ou les chloro-nitrobenzènes (Booth, Boyland et al. 1961). Cette même activité fut mise en évidence chez les organismes photosynthétiques quelques années plus tard avec la découverte d'une activité responsable de la conjugaison de l'atrazine par le glutathion protégeant ainsi les cultures de sorgho contre cet herbicide (Lamoureux, Shimabukuro et al. 1970; Shimabukuro, Frear et al. 1971). Ces enzymes, identifiées bien plus tard sont responsables de la détoxication cellulaire de ces composés au travers de la formation de conjugués covalents glutathionylés. Au cours des 30 dernières années, de nombreuses protéines partageant de fortes identités de séquence et des activités similaires de transfert de glutathion sur des molécules variées ont été regroupées dans une même famille (Habig, Pabst et al. 1974; Habig, Pabst et al. 1974). La famille des glutathion transférases (GST) (EC 2.5.1.18), autrefois appelées glutathion S-transférases, est une famille multigénique d'enzymes présente dans les trois domaines du vivant. Cette présence ubiquitaire met ainsi en évidence une origine très ancienne de ces enzymes ainsi que des fonctions, sans doute, fondamentales conservées au cours de l'évolution.

2. Les trois types de GSTs : similitudes et différences

Combinée au séquençage croissant de nouveaux génomes, l'augmentation du nombre de GSTs identifiées, a permis de débuter les premières études phylogénétiques de cette famille d'enzymes et d'établir le premier schéma. Ce schéma évolutif, basé sur l'analyse des séquences primaires des protéines et sur la présence des GSTs au sein de différents organismes, a été abandonné rapidement car il était incomplet (Coschigano and Magasanik 1991; Pemble and Taylor 1992). En effet, la caractérisation successive de nouvelles GSTs, basée uniquement sur la capacité de glutathionylation, a très vite montré des faiblesses. Ce schéma évolutif était incapable d'expliquer certaines homologies et/ou différences entre GSTs présentes chez un même organisme. Avec l'accumulation des données structurales, trois grands groupes de GSTs ont pu être identifiés et servir de base au modèle évolutif

aujourd'hui largement accepté. Les GSTs ont été réparties et classées, dans un premier temps, en trois grands groupes : (i) les GSTs cytosoliques ou solubles, identifiées dans le cytoplasme et qui constituent le groupe le plus étendu (ii) les GSTs microsomales appartenant à la famille des MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoids and Glutathione metabolism) et enfin (iii) les GSTs Kappa, également solubles et identifiées dans les mitochondries et les peroxysomes (Pemble, Wardle et al. 1996; Jakobsson, Morgenstern et al. 1999; Frova 2006). Ces trois grands groupes de GSTs se différencient entre autres par l'arrangement de leurs structures secondaires et tertiaires voire quaternaires. Par la suite, la caractérisation de nouvelles GSTs dites cytosoliques a montré que certaines isoformes étaient présentes non seulement dans le noyau et les mitochondries mais aussi dans les peroxysomes, les chloroplastes et les membranes cellulaires. Bien qu'il soit encore parfois employé, le terme « cytosolique » n'est plus adéquat pour évoquer ces GSTs. Seul le terme GST a été conservé. Toutefois, on peut également rencontrer le terme de GSTs canoniques, terme principalement utilisé dans ce manuscrit afin de clarifier le discours. En revanche, les dénominations Kappa et MAPEG ont été conservées pour discriminer les deux autres groupes. A l'exception des MAPEGs qui ne partagent que la fonction biochimique des GSTs, les deux autres groupes partagent, non seulement entre elles mais également avec d'autres familles d'enzymes, un repliement structural de type thiorédoxine. Il est ainsi admis aujourd'hui que ces GSTs appartiennent à la superfamille des protéines à motif thiorédoxine à l'instar des glutarédoxines, des glutathion peroxydases ou encore des peroxyrédoxines (Frova 2006).

Les GSTs canoniques et les GSTs Kappa se se différencient respectivement par l'addition en position C-terminale du motif thioredoxine ou par l'insertion dans ce même motif d'un domaine hélicoïdal (Figure 44). Ces deux processus ont par ailleurs également conduit à l'émergence d'autres familles d'enzymes à motif thiorédoxine telles que les glutathion peroxydases (Figure 44). L'addition ou l'insertion du domaine hélicoïdal semble correspondre à une étape ancestrale de fusion de gènes entre celui codant le motif thiorédoxine et celui codant le domaine tout hélice. Cependant, aucun gène ou pseudogène correspondant au domaine hélicoïdal n'a encore été recensé. A l'heure actuelle, il est également envisagé que les GSTs Kappa seraient apparues après les GSTs canoniques par le repositionnement du domaine hélicoïdal au sein du motif thiorédoxine.

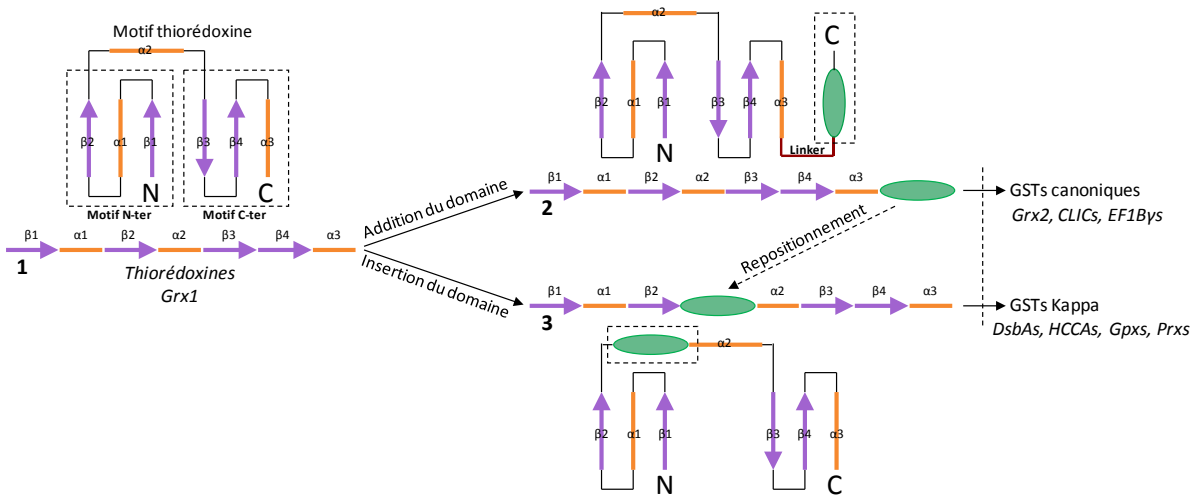


Figure 44 : Emergence des GSTs canoniques et Kappa à partir du motif thiorédoxine ((Frova 2006)). Représentation schématique de l'émergence des GSTs canoniques et des GSTs Kappa à partir d'un ancêtre commun de type thiorédoxine. Les hélices α sont représentées par des rectangles orange et les brins β par des flèches violettes. Le domaine hélicoïdal (additionné ou inséré) est représenté par une ellipse verte. N et C correspondent respectivement aux extrémités N- et C-terminales des motifs. Les noms en italique correspondent à des protéines/familles de protéines possédant le motif représenté (1, 2 ou 3). L'hypothèse du repositionnement du domaine hélicoïdal au sein du motif thiorédoxine, symbolisé par une flèche en pointillée, est également envisagé pour expliquer l'apparition des GSTs Kappa.

3. Les GSTs : objet de l'étude

a. Evolution

Les GSTs canoniques ou GSTs, peuvent être représentées par plus de 80 isoformes chez certaines espèces de plante comme *Populus trichocarpa* ou *Oryza sativa* (Liu, Han et al. 2013). En général, les variations de séquences ne sont suffisantes pour regrouper chaque isoforme en différentes classes qui sont le plus souvent désignées par une lettre grecque. D'autres paramètres tels que leurs propriétés enzymatiques, structurales et fonctionnelles peuvent être utilisés en complément. L'appartenance d'une GST à une classe peut rester assez complexe à définir dans certains cas. En effet, de nombreuses GSTs présentent des activités et des structures tridimensionnelles proches. De plus, certaines classes de GSTs sont retrouvées dans plusieurs règnes du vivant, voire tous, alors que d'autres sont spécifiques à certains règnes ou phyla (Table 1).

Classe de GST	Symbole	Origine	Oligomérisation	Résidu catalytique
Alpha	A	Mammifères	Dimérique	Tyr
Bêta	B	Bactéries	Dimérique	Cys
Gamma	G	Champignons	Dimérique	Tyr
Delta	D	Insectes	Dimérique	Ser
Epsilon	E	Insectes	Dimérique	Ser
Zêta	Z	Animaux, plantes et bactéries	Dimérique	Ser
Thêta	T	Animaux, plantes et bactéries	Dimérique	Ser
Lambda	L	Plantes	Monomérique	Cys
Mu	M	Mammifères	Dimérique	Tyr
Nu	N	Nématodes	?	Tyr
Pi	P	Mammifères	Dimérique	Tyr
Rhô	R	Poissons	Dimérique	?
Sigma	S	Animaux, algues rouges et brunes	Dimérique	Tyr
Tau	U	Plantes	Dimérique	Ser
Phi	F	Plantes	Dimérique	Ser
Chi	C	Bactéries	Dimérique	?
Oméga	O	Mammifères, champignons et insectes	Dimérique	Cys
DHAR	-	Plantes	Monomérique	Cys
GHR	-	Champignons et procaryotes	Dimérique	Cys
GTE	-	Champignons	Dimérique	?
GTT	-	Champignons	Dimérique	?
TCHQD	-	Plantes et bactéries	Dimérique	?
Ure2p-like	-	Champignons et bactéries	Dimérique	Asn

Table 1 : Classification des GSTs (d'après (Jacquot, Dietz et al. 2013)).

Au sein d'un génome, les gènes codant certaines classes de GSTs peuvent s'organiser sous forme de clusters. Ainsi, chez l'Homme, les gènes codant les GSTs Alpha, Mu et Thêta forment des clusters de gènes regroupés sur des portions spécifiques du génome. Chez la souris et les insectes, les gènes codant respectivement les GSTs des classes Pi et Delta sont également organisés en clusters (Henderson, McLaren et al. 1998; Morel, Rauch et al. 2002; Ding, Ortelli et al. 2003). L'analyse phylogénétique des GSTs a également montré que les GSTs spécifiques d'un règne sont toujours plus abondantes que les GSTs communes à différents types d'organismes. Par exemple, chez l'espèce *P. trichocarpa*, les gènes codant les GSTs Tau (GSTUs) sont les plus nombreux et se regroupent en 7 clusters physiques de gènes (Figure 45) (Lan, Yang et al. 2009). Cette organisation quasi systématique traduit des événements de duplication successifs sources de l'explosion du nombre de copies de gènes.

Le fort développement des classes spécifiques à un phylum reflète également un mécanisme évolutif d'adaptation de ces espèces à l'environnement.

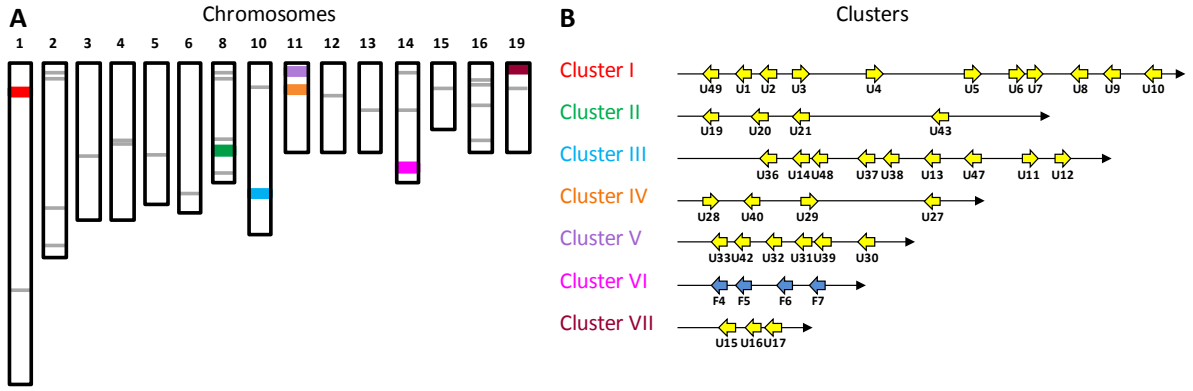


Figure 45 : Position chromosomique et répartition en clusters physiques de gènes codant les GSTs Tau et Phi chez le peuplier *Populus trichocarpa* (d'après (Lan, Yang et al. 2009)).

A. Représentation schématique des chromosomes du peuplier porteur de gènes codant des GSTs. Les barres de couleur correspondent aux clusters représentés en B et les barres grises à des gènes isolés codant des GST Tau (GSTUs) et Phi (GSTFs) ainsi que pour les autres classes de GSTs.

B. Représentation des 7 principaux clusters de gènes codant les GSTs Tau (U) et Phi (F). Les flèches jaunes et bleues correspondent respectivement aux gènes codant pour les GSTUs et GSTFs. Les numéros indiquent les différentes isoformes.

À la fin des années 90, le modèle d'évolution des GSTs était basé sur l'hypothèse que les diverses classes de GSTs proviennent d'un processus d'amplification de gènes suivi d'une évolution divergente conduisant à la création de nouvelles activités catalytiques (Armstrong 1997; Hansson, Widersten et al. 1999). Ce modèle a été affiné dans les années 2000 et le modèle évolutif des GSTs, aujourd'hui accepté, est le modèle qui a été proposé par Frova en 2006 (Frova 2006). Il est basé non seulement sur la présence de certaines GSTs chez différents types d'organismes mais également sur les données biochimiques et structurales. Ce modèle repose sur l'évolution d'un ancêtre commun de type glutaredoxine, constitué par un domaine N-terminal de type thioredoxine auquel a été greffé un domaine hélicoïdal à son extrémité C-terminale (Frova 2006). Cette protéine, ancêtre des GSTs canoniques actuelles a alors subi une évolution en trois étapes. La première étape a consisté en une dimérisation des protéines et les deux autres à des substitutions de l'acide aminé catalytique. Lors de la seconde étape, le résidu cystéine présent au sein du motif thiorédoxine de l'ancêtre commun a été substitué par une sérine puis par une tyrosine au cours de la troisième étape (Figure 46) (Frova 2006). Ainsi, les GSTs des classes déshydroascorbate réductases (DHARs) et Lambda (GSTLs) sont actives sous formes monomériques à l'instar de la glutarédoxine 2 d'*E. coli*.

Les GSTs de toutes les autres classes décrites à l'époque sont actives sous forme dimérique. Si le changement de l'acide aminé catalytique a permis aux enzymes de se diversifier et d'accepter d'autres substrats, il a surtout provoqué l'acquisition de nouvelles fonctions. En effet, le remplacement de la cystéine catalytique en sérine catalytique a conduit à l'apparition de l'activité de transfert de glutathion. Cette capacité a été également conservée chez les GSTs Alpha et Mu pour lesquelles une tyrosine catalytique a ultérieurement remplacé la sérine. Les GSTs ayant divergé tôt au cours de l'évolution ont conservé cet état monomérique et cette cystéine catalytique ancestrale alors que les GSTs ayant divergé plus tard sont devenues dimériques et leur résidu catalytique a été modifié en sérine puis en tyrosine (Figure 46).

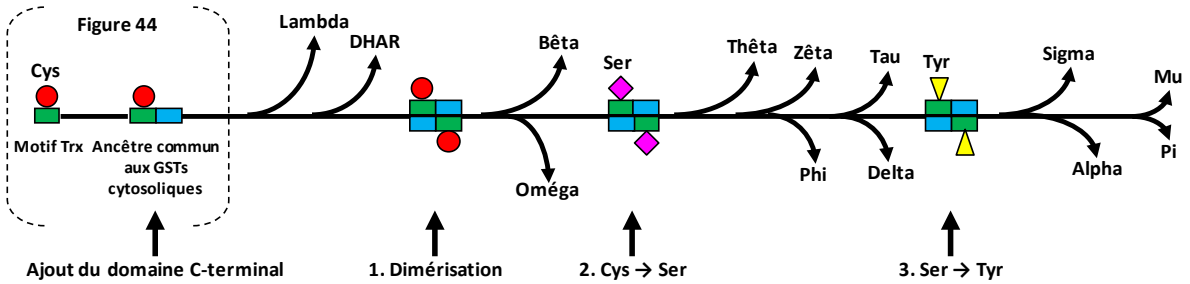


Figure 46 : Modèle évolutif des GSTs à partir d'un ancêtre commun de type thiorédoxine (adapté de (Frova 2006)).

Les motifs thiorédoxine et hélicoïdal sont respectivement représentés en vert et en bleu. Les trois étapes majeures de cette évolution sont représentées par des flèches verticales noires. Le résidu catalytique du motif thiorédoxine est schématisé par un rond rouge, un losange rose et un triangle jaune correspondant respectivement à une cystéine (Cys), une sérine (Ser) et une tyrosine (Tyr). Les flèches courbées noires correspondent à la divergence d'une classe particulière.

Néanmoins, la divergence pécoce d'une classe par rapport à une autre ne justifie pas sa présence actuelle dans plusieurs règnes biologiques. Par exemple, les GSTs Lambda (GSTLs) sont uniquement présentes chez les organismes photosynthétiques alors qu'elles constitueraient la première classe à avoir divergé au cours de l'évolution. La non-conservation des gènes correspondants chez les bactéries et les animaux peut notamment être le résultat de deux phénomènes. Soit les GSTLs ne sont pas nécessaires à ces organismes et les gènes correspondants perdus au cours de l'évolution, soit d'autres protéines semblables (Bêta et Oméga, respectivement chez les bactéries et les animaux) se sont spécialisées afin d'assurer cette fonction.

b. Structure des GSTs

i. Cas général de la structure typique

Le plus souvent homo- ou hétérodimériques, les GSTs ont une masse moléculaire d'environ 50 kDa, soit environ 250 à 300 acides aminés par monomère. Si l'hétérodimérisation intra-classe est possible *in vitro*, elle n'a pour l'instant jamais été mise en évidence *in vivo*. En revanche, aucune hétérodimérisation inter-classe, *in vivo* ou *in vitro*, n'a été décrite à ce jour. Pour les protéines de mammifères, la nomenclature adoptée indique la présence des deux isoformes formant le dimère. Ainsi, le terme GSTO1-1 décrit un homodimère de GST Oméga (GSTO) formé par deux sous-unités 1 (1-1). Pour toutes ces GSTs dimériques, chaque monomère, ou sous-unité, comprend deux domaines, un domaine N-terminal constitué par le motif thiorédoxine et un domaine C-terminal constitué par le domaine ajouté hélicoïdal (Figures 47 et 48). Le domaine N-terminal contient un motif thioredoxine constitué d'un arrangement de quatre brins β et de trois hélices α pour former un enchaînement β1α1β2α2β3β4α3. Au niveau tridimensionnel, les quatre brins β antiparallèles sont entourés par les trois hélices α (Figure 47).

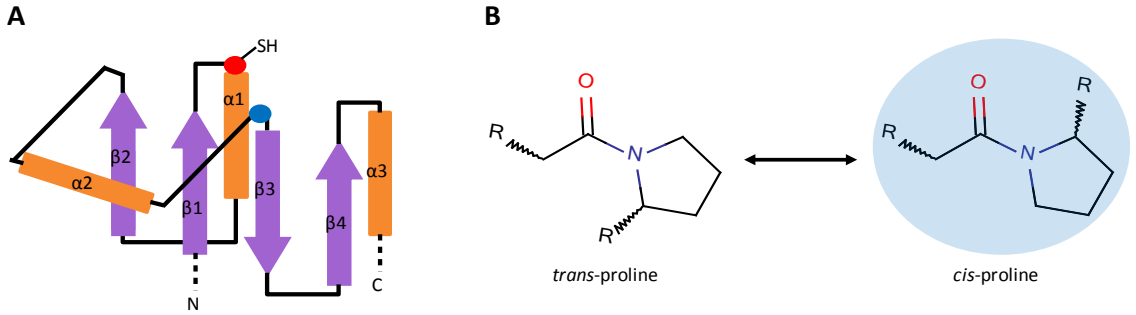


Figure 47 : Motif à repliement thiorédoxine ((Atkinson and Babbitt 2009)).
A. Représentation schématique du repliement thiorédoxine. Les hélices α sont représentées par des rectangles orange et les brins β par des flèches violettes. Les positions de la cystéine catalytique et de la *cis*-proline sont respectivement représentées par une pastille rouge ou bleue.
B. Représentation des conformations *trans* et *cis* de la proline.

Afin de se replier correctement, ce motif nécessite en amont du brin β3 la présence d'un résidu proline en conformation *cis* (Figure 47). Cette *cis*-Pro induit la formation d'un coude au sein de la chaîne polypeptidique favorisant ainsi le repliement du motif (Figure 47). Ainsi, la cystéine catalytique caractéristique du motif thiorédoxine se situant au début de l'hélice α1 est exposée au solvant (Figure 47). Les domaines N- et C-terminaux participent à la formation de deux sites bien définis appelés sites G et H. Le site

G est responsable de la reconnaissance et de la fixation du glutathion, alors que le site H est impliqué dans la reconnaissance du second substrat de nature variée. Au niveau tridimensionnel, le site G est majoritairement formé par des résidus du domaine N-terminal alors que le site H est, quant à lui, principalement formé par les résidus du domaine C-terminal. Conjointement, ces deux sites forment le site catalytique d'une sous-unité (Figure 48) (Sheehan, Meade et al. 2001). Chaque GST dimérique possède ainsi deux sites catalytiques. Néanmoins, leur dépendance, indépendance ou synergie réactionnelle restent inconnues.

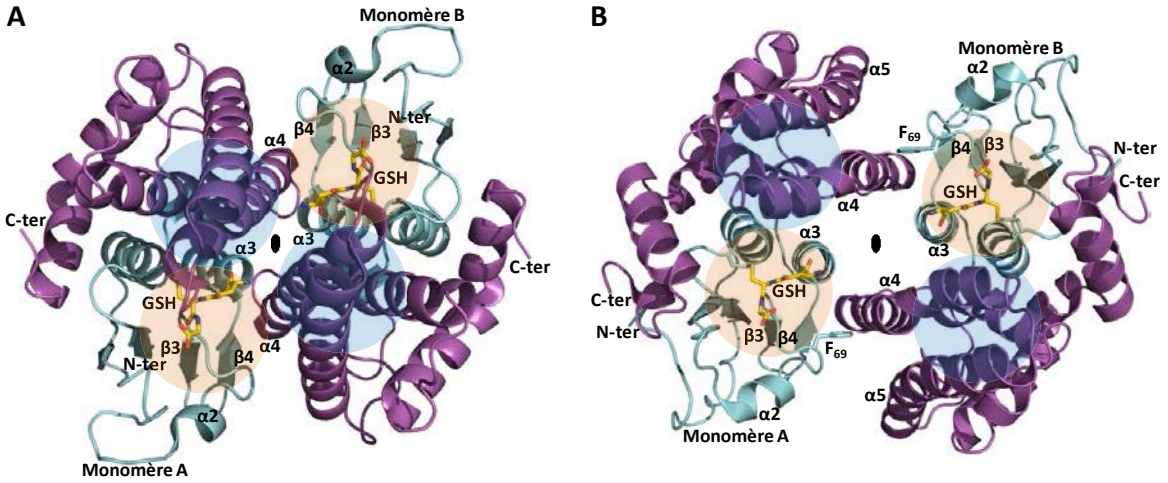


Figure 48 : Structure tridimensionnelle classique des GSTs dimériques.
Exemples de structure tridimensionnelle adoptées classiquement par les GSTs dimériques : (**A**) GST Bêta d'*Ochrobactrum anthropi* (code PDB : 2NTO) et (**B**) GSTO1-1 humaine (code PDB : 1EEM). Les représentations structurales ont été réalisées à l'aide du logiciel Pymol. Les domaines N-terminaux et C-terminaux sont représentés respectivement en cyan et violet et les sites G et H par des pastilles orange et bleues. Les sous-unités s'associent selon un axe structural C2 (ovale noir), le domaine N-terminal d'un monomère (boucle α2-β3 ; brin β4 et hélice α3) interagit avec le domaine C-terminal (hélices α4 et α5) de l'autre monomère. L'interface du dimère est soit hydrophile (**A**) soit hydrophobe (**B**). Cette dernière est caractérisée chez les GSTs Oméga par la présence d'une phénylalanine (F69) dans la boucle α2-β3 au sein de la poche hydrophobe formée par les hélices α4 et α5 de la seconde sous-unité (motif « clé-serrure »). GSH : glutathion représenté en bâtonnets.

Le site G, relativement très conservé, est responsable de l'activation du glutathion par ionisation. Il permet de former l'anion thiolate (S^-) hautement réactif en abaissant le pKa du groupement thiol (SH) de la cystéine du glutathion. Ainsi, l'abaissement de ce pKa de 8.7 à environ 6.2 rend la molécule de glutathion fortement nucléophile à pH physiologique (Kolm, Sroga et al. 1992; Kong, Nishida et al. 1992; Labrou, Mello et al. 2001). Cet anion thiolate est stabilisé par des liaisons hydrogène avec les chaînes latérales des résidus de la protéine et permet l'attaque nucléophile de substrats électrophiles (Dirr, Reinemer et al. 1994;

Armstrong 1997). Les résidus impliqués dans la fixation, l'activation et la stabilisation du glutathion sont donc nécessaires à l'activité enzymatique de la protéine et sont de ce fait très conservés dans la plupart des GSTs (Atkinson and Babbitt 2009). L'anion thiolate est notamment stabilisé par le résidu catalytique du motif thiorédoxine. Ce résidu est positionné dans la majorité des cas en fin du brin β1 pour les GSTs à tyrosine ou en début d'hélice α1 pour les GSTs à sérine et à cystéine. Néanmoins, pour les GSTs à cystéine catalytique, l'anion thiolate du glutathion ne sera pas stabilisé par un acide aminé hydroxylé. Les groupements thiols de chaque cystéine, respectivement de la protéine et du glutathion, interviendront dans la formation d'un pont disulfure (Figure 49).

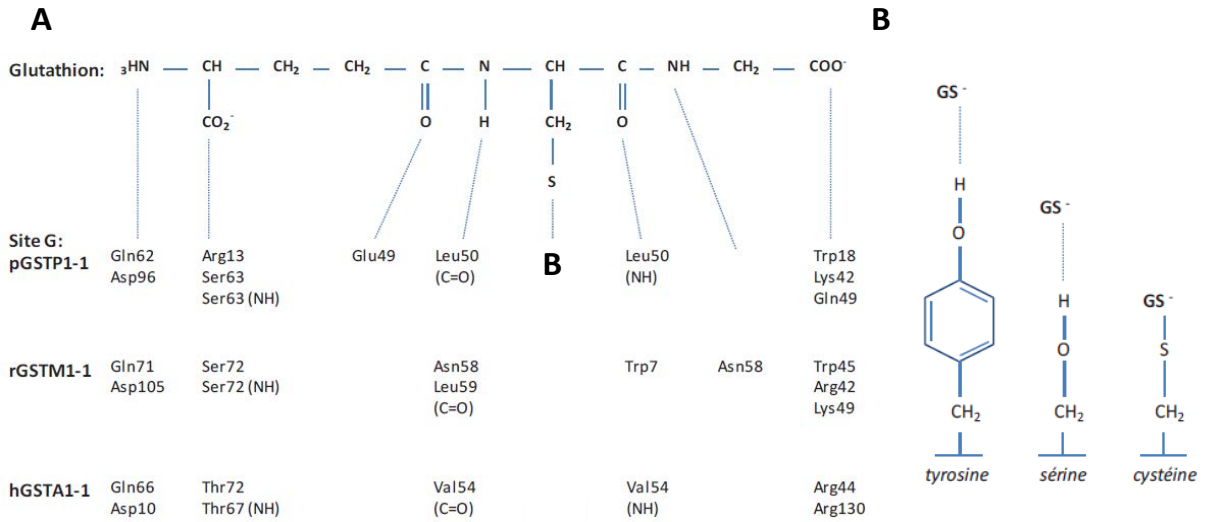


Figure 49 : Représentation schématique des résidus impliqués dans l'interaction avec le glutathion ((Dirr, Reinemer et al. 1994; Sheehan, Meade et al. 2001)).

A. Résidus permettant la reconnaissance et la stabilisation du glutathion chez trois classes de GSTs (Pi, Mu, Alpha) provenant respectivement de trois mammifères différents, le porc (p), le rat (r) et l'homme (h).

B. Résidus en interaction directe avec la cystéine du glutathion. Selon la classe de GSTs, il y a formation et stabilisation de l'anion thiolate par une liaison hydrogène (résidus tyrosine et sérine) ou formation d'un pont disulfure (résidu cystéine).

Au-delà de cet acide aminé catalytique, il existe quelques variations au niveau de la nature des résidus interagissant avec le glutathion. Cependant, bien que la nature de certains résidus semble spécifique à certaines classes, leur positionnement au sein de la structure primaire varie très peu (Figure 49) (Atkinson and Babbitt 2009). Parmi ces résidus, trois semblent primordiaux pour le maintien du glutathion dans le site actif de l'enzyme, tant au niveau de leur nature que de leur position. Ainsi, le résidu précédant la *cis*-Pro qui peut être soit une valine, une leucine, une isoleucine ou une thréonine, permet également la stabilisation de la cystéine du glutathion par maintien de son squelette carboné à l'aide de liaisons hydrogène. Le second résidu, une sérine très conservée au sein des différentes classes

de GSTs, se situe au niveau de la boucle β4-α3. Ce résidu, précédé le plus fréquemment par un résidu glutamate, aspartate ou glutamine, intervient dans la stabilisation de la charge portée par le résidu glutamate du glutathion. Enfin, le troisième résidu, majoritairement présent pour toutes les classes de GSTs est un résidu lysine ou arginine, situé dans la boucle β2-α2 du motif thiorédoxine. Il stabilise, par l'intermédiaire d'un pont salin, le groupement carboxyle du résidu glycine du glutathion. La forte conservation du site G entre les différentes classes de GSTs met donc en évidence que la fixation, l'orientation, la stabilisation et l'ionisation du glutathion au sein du site actif des GSTs sont des paramètres importants.

A l'inverse du domaine N-terminal, le domaine C-terminal de la protéine présente une plus grande variabilité au sein des GSTs. Les acides aminés composant ce domaine, généralement hydrophobes, sont souvent moins conservés entre classes et au sein d'une même classe de GSTs. De plus, le nombre d'hélices α constituant ce domaine n'est pas identique pour toutes les classes. Si certaines GSTs ne possèdent que cinq hélices α dans ce domaine, comme les GSTs Pi et Mu (Reinemer, Dirr et al. 1991), d'autres en possèdent six à l'instar des GSTs Alpha (Sinning, Kleywegt et al. 1993), voire plus comme les GSTLs (9 hélices α). Les sites H des GSTs peuvent donc s'avérer très différents, notamment entre classes (Dirr, Reinemer et al. 1994; Wilce and Parker 1994). Cette grande variabilité du site H au sein des GSTs permet ainsi la prise en charge d'une grande variété de substrats se distinguant notamment par leurs encombrements stériques et/ou la présence de groupements fonctionnels différents. Elle peut également expliquer pour certaines GSTs le manque de spécificité vis-à-vis de certains substrats (Wilce and Parker 1994; Armstrong 1997). Comparés à ceux constituant le site G, les résidus du site H, impliqués dans l'interaction avec le substrat, sont très rarement identifiés du fait d'un manque de données structurales. De plus, le substrat, lié de façon non covalente dans le site actif des enzymes et libre de mouvements, peut être perdu lors des étapes de purification et de cristallisation.

Un autre déterminant majeur de la reconnaissance d'un substrat par les GSTs dimériques réside dans l'interface de dimérisation formée par l'association des monomères. Les sous-unités s'associent typiquement selon un axe de symétrie C2, le domaine N-terminal d'un monomère étant en interaction avec le domaine C-terminal de l'autre monomère (Figure 48). Il se forme ainsi une région entre les deux sous-unités qui peut varier entre classes de GSTs, tant au niveau physique que chimique (Figure 50).

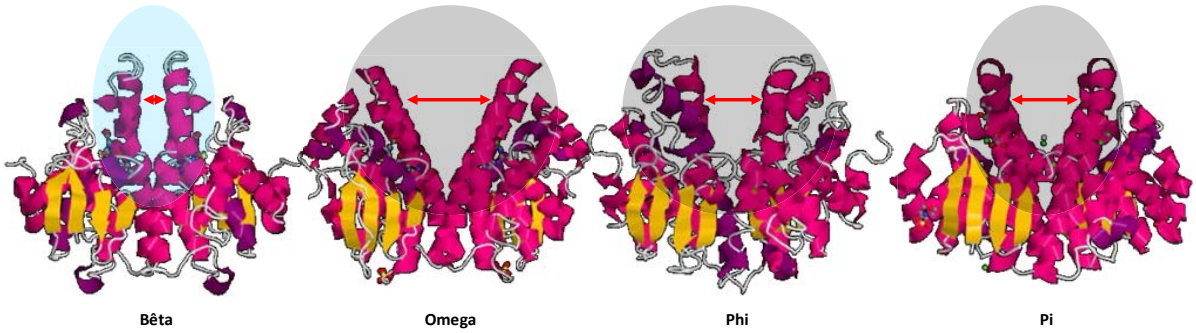


Figure 50 : Structure tridimensionnelle de l'interface de dimérisation de quatre classes de GSTs.
Exemples des variations dans la structure tridimensionnelle de l'interface de dimérisation de quatre classes de GSTs. Les dimères de GSTs Bêta (code PDB : 1PMT), Oméga (code PDB : 1EEM), Phi (code PDB : 1BYE) et Pi (code PDB : 3N9J) ont été choisis pour leurs différences importantes au niveau de l'interface de dimérisation. Cette interface est représentée par une ellipse bleue ou grise lorsqu'elle est respectivement hydrophile ou hydrophobe. L'ouverture de la gorge conduisant au site catalytique est représentée par une double flèche rouge. Les images des structures ont été réalisées sur le site PDB via le plugin Java. Les brins β sont en jaune et les hélices α en pourpre et en violet.

Cette interface de dimérisation forme une gorge accessible aux substrats dont les propriétés sont gouvernées par les sites G et H et les hélices α la constituant. Néanmoins, deux paramètres majeurs régissent cette région. En effet, en fonction du nombre des hélices α, de leur tailles et de leurs orientations, notamment les hélices α4 et α5, cette région sera plus ou moins ouverte (Figure 50). Ces paramètres constituent une contrainte physique liée à l'encombrement stérique de certains substrats. Le second point important concerne l'hydrophobicité de la gorge notamment au niveau du site H et des hélices α avoisinantes. Si elle est plus ou moins hydrophobe dans la majorité des classes de GSTs, l'interface de dimérisation peut également être hydrophile comme c'est le cas pour les GSTs Bêta (Figure 50). Cette différence d'environnement moléculaire influence fortement les spécificités de substrats. Outre ces deux propriétés, la nature des résidus impliqués dans l'interface de dimérisation semble également d'une importance notable pour l'activité enzymatique des protéines. En effet, dans le cas d'une GST Tau de blé, deux résidus de cette interface, non essentiels à la dimérisation, contribuent à l'activité catalytique et à la stabilité thermique de l'enzyme mais également à la reconnaissance des substrats (Wang and Yang 2011). Enfin, parmi les GSTs de la classe Delta, spécifique aux insectes, l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager conduit à la production de quatre protéines différentes. Ces enzymes, variant notamment par les résidus présents dans l'interface de dimérisation, présentent des propriétés catalytiques et des spécificités de substrats très différentes (Piromjitpong, Wongsantichon et al. 2007).

ii. Cas des structures atypiques

Si la grande majorité des GSTs identifiées jusqu'ici adopte la structure dimérique décrite précédemment, d'autres adoptent une organisation structurale atypique voire très différente. Quelques unes de ces structures sont présentées ici.

Les GSTs Lambda et DHAR, précisément décrites en 2002 (Dixon, Davis et al. 2002), ont été distinguées des GSTs Oméga alors qu'aucune structure n'était résolue. En effet, bien que proches des GSTs Oméga tant d'un point de vue biochimique que structural, l'étude plus fine de ces enzymes (Dixon, Davis et al. 2002) a montré non seulement qu'elles étaient spécifiques des organismes photosynthétiques mais surtout qu'elles étaient actives sous forme monomérique. Or, les GSTs Oméga qui sont rencontrées aussi bien chez les mammifères que chez les champignons sont des enzymes dimériques en solution (Board, Coggan et al. 2000; Meux, Morel et al. 2013). De plus, la spécialisation des DHARs dans la réduction du DHA en ascorbate montre une spécialisation importante de ces protéines pour cette réaction, contrairement aux GSTLs et GSTOs. Conjointement, ces paramètres ont donc abouti à l'établissement de deux nouvelles classes de GSTs bien définies, qui, à l'heure actuelle, sont les deux seules classes dont les membres se trouvent sous forme monomériques.

Parmi les GSTs qui forment une interface dimérique non classique, les membres des classes mPGES2, GHR et FuA serviront d'exemples (Yamada, Komoto et al. 2005; Meux, Prosper et al. 2011; Mathieu, Prosper et al. 2012). Bien que présentant les motifs caractéristiques des GSTs, ces enzymes possèdent des séquences additionnelles au sein du motif thiorédoxine et/ou du domaine C-terminal qui sont responsables d'une dimérisation atypique en empêchant la formation des contacts habituellement observés dans les autres cas (Figure 51). L'organisation tridimensionnelle des mPGES2s et FuAs reste toutefois semblable à la dimérisation typique des GSTs dimériques. L'axe de symétrie C2 et l'interaction du domaine N-terminal d'une sous-unité avec le domaine C-terminal de l'autre sous-unité sont conservés (Figure 51). En revanche, les GHRs ont un mode d'organisation tridimensionnelle totalement différent. L'axe de symétrie est en C2 mais seuls les domaines C-terminaux des deux sous-unités interagissent entre eux, conférant à ces protéines des caractéristiques biochimiques propres (Figure 51).

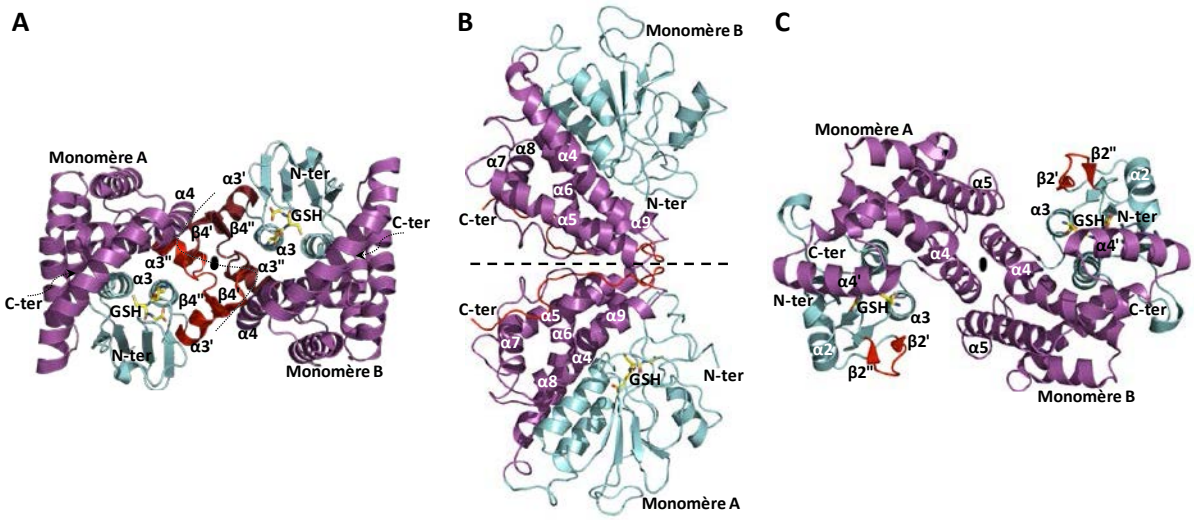


Figure 51 : Structure tridimensionnelle des GSTs mPGES2, GHR et FuA.
Exemple de dimérisation particulière des GSTs de la classe des mPGES2 (A), GHR (B) et FuA (C). Les dimères de GSTs représentés ont été réalisées via le logiciel Pymol et des codes PDB 2PBJ (mPGES-2), 3PPU (GHR) et 4G19 (FuA). Les domaines N-terminaux et C-terminaux sont représentés respectivement en cyan et violet. Les séquences additionnelles spécifiques de ces classes sont représentées en rouge et les structures secondaires en résultant par des symboles prime (') et seconde (") sur les hélices α et les brins β correspondant. Les monomères s'associent selon un axe structural C2 (ovale et ligne pointillée noir) dans le cas des mPGES2s, GHRs et FuAs. GSH : glutathion en mode bâtonnets.

A l'exception des GSTs Lambda et DHAR, toutes les GSTs dont la structure tridimensionnelle a été résolue adoptent une organisation dimérique. Cependant, la résolution structurale récente d'une GST du protozoaire *Leishmania infantum* (TDR1) a mis en évidence une organisation trimérique selon un axe de symétrie C3 (Figure 52) (Fyfe, Westrop et al. 2012). Chaque sous-unités est constituées par deux domaines GSTs, nommés domaine I et domaine II, reliés entre eux et provenant probablement de la fusion de deux gènes codant des GSTs (Fyfe, Westrop et al. 2012). Chaque domaine comprend un motif thiorédoxine et un domaine hélicoïdal (Figure 52). Au sein de ce trimère, la dimérisation classique des GSTs est retrouvée et s'organise entre deux domaines par l'intermédiaire du domaine I d'une sous-unité et du domaine II d'une autre sous-unité. Cette particularité lui confère très certainement des fonctions précises encore non élucidées.

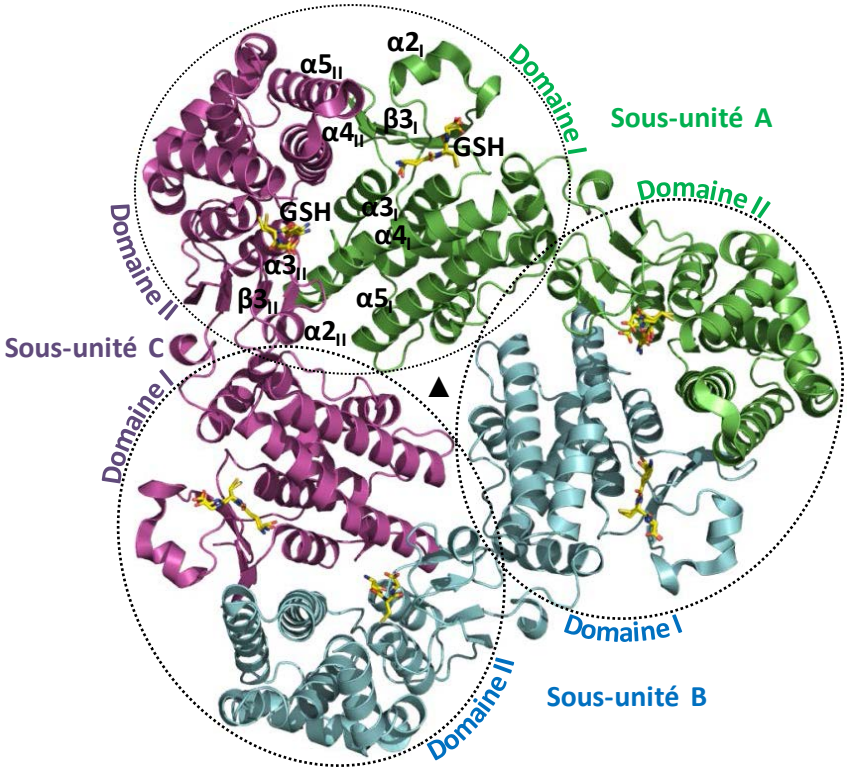


Figure 52 : Organisation tridimensionnelle en trimère de la GST TDR1 de *Leishmania infantum*.
La représentation du trimère a été généré à l'aide du logiciel Pymol et du code PDB 4AGS. Les 3 sous-unités constituées de deux domaines GSTs fusionnés (domaine I et domaine II) sont représentées par trois couleurs différentes (bleu, violet et vert). La dimérisation classique entre deux domaines (domaine I d'une sous-unité et domaine II d'une autre sous-unité) est indiquée par un cercle pointillé. Les hélices α et les brins β mis en jeu dans cette dimérisation sont représentés pour l'interaction entre la sous-unité A et la sous-unité C, I et II correspondant aux structures secondaires respectives du domaine I de la sous-unité A et du domaine II de la sous-unité C. L'axe de symétrie C3 est représenté par un triangle noir. GSH : glutathion en mode bâtonnets.

iii. Cas particulier des GSTs Kappa et MAPEG

Les GSTs Kappa se distinguent des GSTs canoniques par le fait que le domaine tout hélice généralement positionné du côté C-terminal du domaine thioredoxine est placé au sein même du repliement thiorédoxine (entre les brins β2 et β3) Les GSTs Kappa montrent un repliement semblable à celui des protéines disulfide bond A (DsbA), thiol-disulfure oxydoréductases impliquées dans la maturation des ponts disulfure dans le périplasme des bactéries (Figure 53).

A l'instar des GSTs canoniques, les GSTs Kappa sont également des enzymes dimériques. Cependant, le dimère est de forme allongée alors que celui des GSTs canoniques est de forme globulaire (Figure 54). Cette particularité provient d'un mode de dimérisation particulier dû à l'agencement différent des structures secondaires. Malgré ces divergences

structurales, le mode de fixation du glutathion au sein du site actif et la position du résidu catalytique restent similaires (Ladner, Parsons et al. 2004).

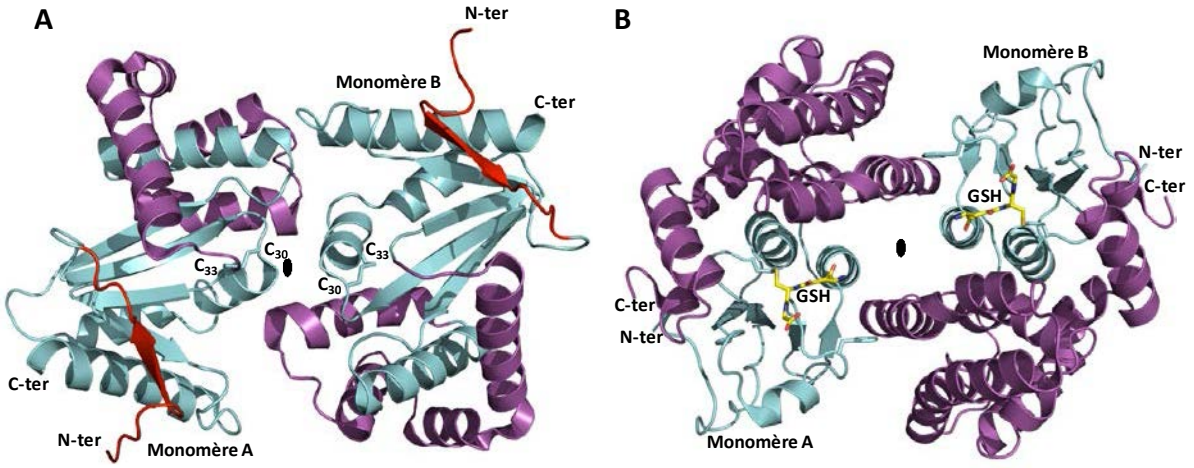


Figure 53 : Organisation tridimensionnelle des protéines DsbA.
Les représentations tridimensionnelles ont été générées à l'aide du logiciel Pymol et des codes PDB : 1DSB pour la DsbA d'*Escherichia coli* (A) et 1EEM pour la GSTO1-1 humaine (B). Les motifs thiorédoxines et hélicoïdaux sont représentés respectivement en cyan et en violet. Le domaine hélicoïdal est inséré au sein du motif thiorédoxine pour la DsbA alors qu'il est ajouté à l'extrémité C-terminale du motif thiorédoxine pour la GSTO. La séquence additionnelle spécifique de la DsbA est représentée en rouge. Les cystéines impliquées dans le mécanisme réactionnel des DsbA sont présentes (C_{30} et C_{33}) et associées par un pont disulfure. Les monomères s'associent cependant selon un même axe structural C2 (ovale noir). GSH : glutathion en mode bâtonnets.

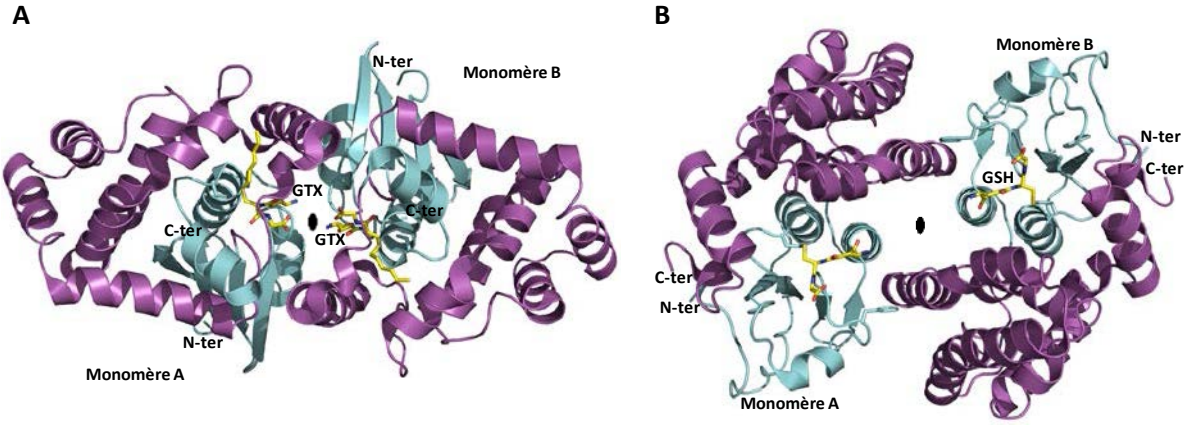


Figure 54 : Organisation tridimensionnelle des GSTs Kappa.
Les représentations tridimensionnelles ont été générées à l'aide du logiciel Pymol et des codes PDB : 3RPN pour la GST Kappa (A) et 1EEM pour la GSTO1-1 (B) humaines. Les motifs thiorédoxines et hélicoïdaux sont représentés respectivement en cyan et en violet. La GST Kappa a une forme allongée contrairement à la forme globulaire de la GST canonique Oméga. Les monomères s'associent selon un axe structural C2 (ovale noir). GSH, glutathion en mode bâtonnets ; GTX, hexyl-glutathion.

Les MAPEGs, réparties en quatre classes (FLAP, LTC4, mPGES1 et mGST), constituent un groupe de GSTs impliquées dans la synthèse des eicosanoïdes, famille de molécules constituées d'acide gras polyinsaturés et oxygénés à 20 atomes de carbone dont font notamment partie les prostaglandines, hormones animales (Hayes, Flanagan et al. 2005). Bien qu'elles possèdent de fortes divergences structurales avec les GSTs canoniques et Kappa, elles sont toutefois classées dans la superfamille des GSTs du fait de leur activité glutathion transférase sur le chloro-dinitrobenzène (CDNB) (Morgenstern, Guthenberg et al. 1982). Ces protéines membranaires ont cependant des structures secondaires et tridimensionnelles totalement différentes des GSTs canoniques ou Kappa. Chaque monomère, formé uniquement d'un paquet d'hélices α, ne présente pas de repliement thiorédoxine mais plutôt un repliement semblable à celui de la sous-unité 1 des cytochrome c oxydases. De plus, toutes ces protéines sont organisées en trimères (Figure 55) (Holm, Bhakat et al. 2006; Ferguson, McKeever et al. 2007; Sjogren, Nord et al. 2013; Niegowski, Kleinschmidt et al. 2014). Enfin, les sites de fixation du glutathion (trois par trimère) sont formés par l'association des résidus de deux monomères et fonctionnent en synergie du côté cytosolique (Holm, Bhakat et al. 2006; Martinez Molina, Wetterholm et al. 2007).

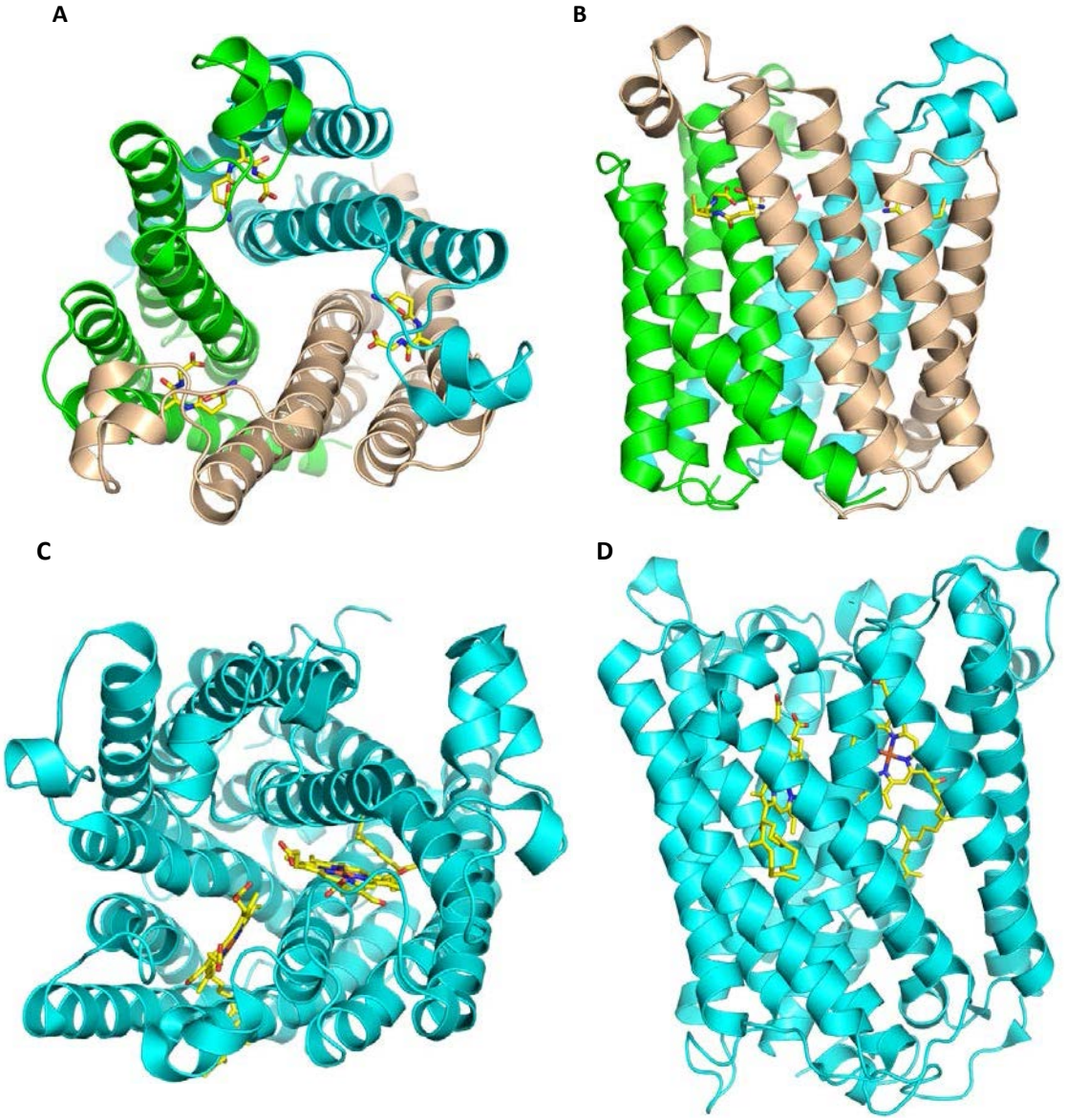


Figure 55 : Organisation tridimensionnelle de GSTs mPGES1 et de la sous-unité 1 des cytochrome C oxydases.

A et B : Représentations tridimensionnelles de la GST mPGES1 humaine (code PDB : 4AL0). C et D : Représentations tridimensionnelles de la sous-unité 1 de la cytochrome C oxydase de *Rhodobacter sphaeroides*. A et C : vue de dessus. B et D : vue de face. Les trois monomères constituant la mPGES1 sont représentés de trois couleurs différentes, respectivement cyan, vert et marron. Ce type de GSTs ne présente pas de motif thiorédoxine et ne comporte que des hélices alpha. Les structures ont été générées à l'aide du logiciel Pymol. Molécules en mode bâtonnets : glutathion pour A et B, hème pour C et D.

Ainsi, la composition du site G, la grande variabilité du site H, la nature de l'interface de dimérisation et l'organisation tridimensionnelle des protéines ont conféré aux GSTs des propriétés différentes, aussi bien entre classes qu'au sein d'une même classe. Toutes ces variations ont eu un impact dans la reconnaissance de nouveaux substrats et l'accomplissement de nouvelles fonctions biochimiques, catalytiques ou non. Cette hyper-

variabilité des GSTs a ainsi joué un rôle crucial au cours de l'évolution et dans l'adaptation des organismes à leurs niches écologiques (Dirr, Reinemer et al. 1994; Wilce and Parker 1994; Salinas and Wong 1999). Pour ne citer que quelques exemples, les GSTs Zêta sont très efficaces lors de réactions d'isomérisation mais ne présentent que de très faibles activités de type peroxydase. A l'inverse, les GSTs Thêta sont essentiellement actives en tant que peroxydases et non en tant que glutathion transférases. Les GSTs Tau, au contraire, possèdent de fortes capacités de glutathionylation de composés toxiques. Enfin, les GSTs à cystéine catalytique semblent être, quant à elles, incapables de catalyser des réactions de type peroxydase, isomérase ou de glutathionylation mais catalysent plutôt des réactions de déglutathionylation, réaction inverse de celle catalysée par les GSTs à sérine et à tyrosine catalytique.

Implication des GSTs dans le métabolisme cellulaire

Les glutathion transférases sont des enzymes principalement impliquées dans les processus de détoxication cellulaire de composés récalcitrants plus ou moins hydrophobes et complexes. Ces endo- et xénobiotiques sont neutralisés à travers la conjugaison d'une molécule de glutathion. L'activité de glutathionylation a par ailleurs contribué à leur découverte et leur regroupement au sein d'une même famille enzymatique (voir le paragraphe concernant l'historique des GSTs) (Booth, Boyland et al. 1961; Lamoureux, Shimabukuro et al. 1970). Depuis cette découverte, les GSTs ont été essentiellement étudiées pour ce processus, aussi bien chez les animaux que chez les plantes. Néanmoins, d'autres fonctions catalytiques ont depuis été mises en évidence pour de nombreuses isoformes. Certaines GSTs sont ainsi capables de catalyser des réactions de type peroxydase, isomérase, thiol-transférase et réductase, voire aussi de déglutathionylation, réaction opposée à la glutathionylation. D'autres encore possèdent des fonctions non catalytiques et agissent comme ligandines pour le transport et/ou le stockage de composés.

1. La glutathionylation

Dans tous les règnes biologiques, de nombreux organismes possèdent un système de détoxication majeur nécessaire à la protection des cellules vis-à-vis de stress générés par des contraintes environnementales. Ce processus, composé de trois phases, permet l'inactivation et/ou l'élimination de composés toxiques d'origines endogène ou exogène (Figure 56) (Coleman, Blake-Kalff et al. 1997). Lors de la première phase, des enzymes telles que les cytochrome P450 monooxygénases catalysent différents types de réaction (oxydation, réduction, hydrolyse, déshalogénation, etc.) afin d'introduire ou d'exposer un groupement fonctionnel électrophile à la surface du substrat. Ce substrat modifié est pris en charge par les enzymes de phase II (Figure 56). Cette seconde phase, réalisée par des enzymes du métabolisme secondaire, consiste à conjuguer ce substrat électrophile à un groupement (acétyle, méthyle, acide glucuronique, etc.) afin qu'il soit reconnu par les acteurs de la troisième phase. Les GSTs interviennent dans cette deuxième phase en prenant en charge des molécules toxiques activées au cours de la phase I. Ces enzymes catalysent l'attaque nucléophile du glutathion sur les substrats électrophiles provenant de la première phase. Cette conjugaison covalente d'une molécule de glutathion, ou glutathionylation, permet notamment

d'augmenter la solubilité du composé et la prise en charge de ce dernier au cours de la troisième phase par des transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette) comme les pompes à composés S-glutathionylés (GS-X pump) (Ishikawa, Li et al. 1997; Keppler 1999). Par l'intermédiaire de ces transporteurs, la molécule glutathionylée est finalement excrétée dans le cas de modèles animaux et/ou séquestrée dans la vacuole et/ou la paroi cellulaire chez les champignons et les plantes (Figure 56) (Coleman, Blake-Kalff et al. 1997; DeRidder, Dixon et al. 2002; Harms, Schlosser et al. 2011; Morel, Meux et al. 2013; Shoji 2014).

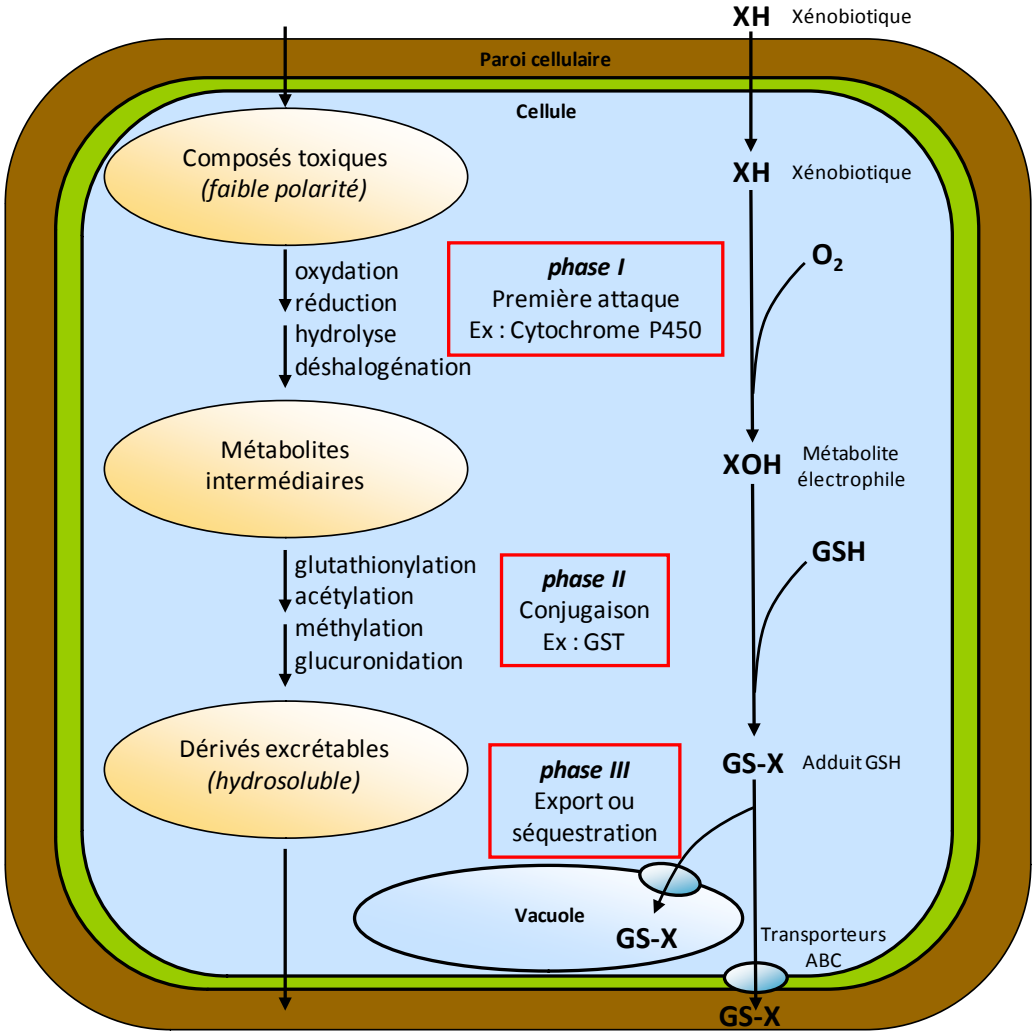


Figure 56 : Représentation du système de détoxication en trois phases chez les plantes et les champignons (d'après (Morel, Meux et al. 2013)).

A gauche de la figure : le mécanisme général du système de détoxication en trois phases. A droite de la figure : exemple de la détoxication, par ce système, d'un xénobiotique chez les plantes ou les champignons. Le composé toxique est modifié par oxydation, lors de la première phase, par les cytochrome P450 monooxygénases. Ce métabolite, devenu électrophile, est ensuite reconnu par les GSTs qui fixent une molécule de glutathion sur ce substrat lors de la deuxième phase. Cependant, la glutathionylation de certains composés par les GSTs peut être spontanée et ne pas nécéssiter de première phase. Enfin, ce composé est séquestré dans la vacuole ou excrété dans la paroi cellulaire lors de la troisième phase.

Récemment, une étude portant sur ce système de détoxication chez les champignons a mis en évidence une corrélation entre le nombre de gènes codant les monooxygénases cytochrome P450 et celui codant les GSTs. Plus le nombre de représentants d'une famille est grand, plus celui de l'autre l'est également. Parmi les champignons dont le génome a été séquencé, les espèces capables de dégrader le bois sont celles qui possèdent le plus grand nombre de monooxygénases cytochrome P450 et de GSTs (Morel, Meux et al. 2013). Outre le processus complexe de dégradation du bois générant des espèces radicalaires et des molécules toxiques (Weedon, Cornwell et al. 2009), ces champignons sont également confrontés aux nombreux métabolites secondaires libérés par les plantes qui constituent leur système de défense (Franceschi, Krokene et al. 2005; Danielsson, Lunden et al. 2011; Freschet, Weedon et al. 2012). Il est suggéré que ce système de protection/détoxication cellulaire par glutathionylation s'est considérablement enrichi au cours de l'évolution, permettant ainsi au champignon de faire face aux différents composés toxiques. La présence de ce système constitue également une adaptation à une niche écologique particulière. Les GSTs animales et végétales ont été principalement étudiées pour leur fonction de conjugaison de molécules électrophiles. En effet, chez les plantes, ce processus majoritairement catalysé par les GSTs des classes Phi et Tau permet une résistance plus ou moins accrue envers les herbicides (Marrs 1996). Chez les mammifères, les GSTs des classes Alpha, Mu et Pi ont un rôle prépondérant dans la détoxication de composés cancérigènes tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les dérivés de benzopyrène ou plus généralement les xénobiotiques (Hu, Ji et al. 1997; Hu and Singh 1997; Hu, Xia et al. 1997; Henderson, Smith et al. 1998; Mitchell, Lakritz et al. 2000). La plupart du temps, les classes de GSTs impliquées dans ce processus de détoxication cellulaire sont spécifiques à un phylum, voire au règne, corroborant ainsi l'adaptation des organismes à leurs niches écologiques. Par exemple, chez les animaux, la résistance vis-à-vis de composés organophosphorés est très variable selon les espèces. Les insectes présentent par exemple de grandes capacités de détoxication de ces composés du fait de la présence et l'expansion des GSTs Epsilon et Delta (Hemingway 2000; Ranson, Rossiter et al. 2001; Wei, Clark et al. 2001; Hemingway, Hawkes et al. 2004; Enayati, Ranson et al. 2005). En revanche, chez les mammifères et les poissons, ces classes sont absentes et sont de ce fait beaucoup plus sensibles à ces substances bien que les classes Thêta et Rhô soient également capables de neutraliser ces composés (Syvanen, Zhou et al. 1996; Abel, Bammler et al. 2004). De plus, les GSTs intervenant au niveau de la phase II ne sont pas distribuées équitablement au sein des différentes espèces, tant au niveau de l'expression que de la simple présence de certaines isoformes rendant

certaines espèces plus ou moins tolérantes à un même composé. Chez les plantes, les espèces exprimant des taux élevés de certaines isoformes de GSTs Tau, comparées à celles exprimant un taux faible voire nul de ces mêmes GSTs, vont présenter une résistance plus importante à certains herbicides. Par exemple, le maïs est résistant à l'atrazine alors que le blé et le pois y sont sensibles car ils ne possèdent pas les GSTs nécessaires à la glutathionylation de ce composé. De la même façon, la tomate est sensible au fluorodifen contrairement au coton ou aux céréales (Marrs 1996).

2. L'isomérisation de métabolites spécifiques

Certaines GSTs catalysent des réactions d'isomérisation de métabolites spécifiques au travers d'une glutathionylation transitoire d'un composé cible. La conjugaison de glutathion sur ces substrats entraîne ainsi une isomérisation spontanée de la molécule. Les GSTs Zêta, conservées à la fois chez les animaux, les plantes et les bactéries, présentent ce type d'activité en catalysant l'isomérisation *cis-trans* du maléylacétoacétate en fumarylacétoacétate. Cette isomérisation constitue une étape clé dans le catabolisme de la tyrosine et de la phénylalanine (Dixon, Cole et al. 2000; Thom, Dixon et al. 2001; Fernandez-Canon, Baetscher et al. 2002). Une GST bactérienne, non-décrite comme une GST Zêta mais appartenant probablement à cette classe, catalyse également ce type de réaction glutathion-dépendante sur le maléylpyruvate (Figure 57) (Marsh, Shoemark et al. 2008; Fang, Li et al. 2011).

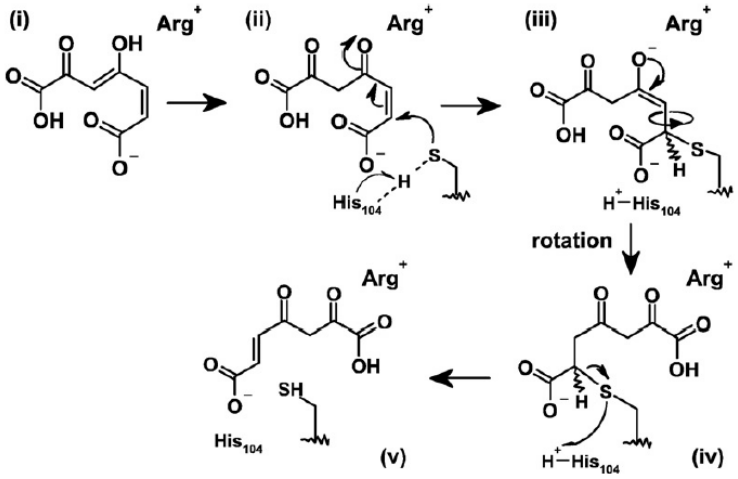


Figure 57 : Mécanisme d'isomérisation du maléylpyruvate ((Marsh, Shoemark et al. 2008)).
Le maléylpyruvate, stabilisé dans le site actif de la maléylpyruvate isomérase, GST de la classe Zêta (i), est attaqué par le glutathion (ii). L'énolate induit est stabilisé par une arginine (iii) puis l'isomérisation spontanée de l'adduit glutathionylé (iv) entraîne la libération de l'isomère ainsi que celle du glutathion (v).

Chez les mammifères, outre les GSTs Zêta, d'autres GSTs possèdent également ce type d'activité. Ainsi, des GSTs Alpha catalysent l'isomérisation de stéroïdes, une classe spécifique de terpénoïdes (Johansson and Mannervik 2001; Raffalli-Mathieu and Mannervik 2005). Elles seraient, de ce fait, fortement impliquées dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, notamment des hormones sexuelles, grâce à la conversion d'intermédiaires de synthèse (Dourado, Fernandes et al. 2014). Les GSTs Pi et Mu, quant à elles, catalysent l'isomérisation de l'acide rétinoïque 13-*cis* et 9-*cis*, caroténoïde tératogènes, en acide rétinoïque *all-trans*, forme active de la vitamine A impliquée dans l'organogénèse embryonnaire (Chen and Juchau 1998). Néanmoins, si l'activité de transformation de ces produits pharmacologiques, respectivement anti-acnéique et anticancéreux, est avérée *in vitro*, l'activité d'isomérisation *in vivo* de ces GSTs sur des molécules naturelles reste à démontrer. L'étude des GSTs chez les mammifères a également mis en évidence l'implication de ces enzymes dans la biosynthèse des prostaglandines. Ainsi, les GSTs des classes Sigma et mPGES2, bien que la classification de ces dernières en tant que GSTs soit discutée, permettent l'isomérisation de la prostaglandine (PG) H2 (PGH2) respectivement en PGD2 et PGE2, intervenant entre autre dans le processus d'inflammation (Watanabe, Kurihara et al. 1997; Jowsey, Thomson et al. 2001).

3. Les GSTs et le stress oxydant

Une des fonctions des GSTs, n'impliquant pas forcément la conjugaison de glutathion, concerne leur intervention dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. En effet, différentes études ont mis en évidence que l'expression et/ou la surexpression de nombreuses GSTs est induite par un grand nombre de stimuli. Concernant les plantes, les études transcriptomiques réalisées chez le peuplier, le riz et Arabidopsis ont révélé que parmi les 10 à 20 gènes les plus exprimés en condition de stress se trouvaient des gènes codant des GSTs. Ces gènes et ces protéines sont accumulées en réponse à des stress s'accompagnant le plus souvent d'un stress oxydant, notamment lors de stress métalliques chez *A. thaliana*, de surexposition à l'arsenate chez *O. sativa* et d'interactions hôte-pathogène chez *P. trichocarpa* (Kochian, Hoekenga et al. 2004; Rinaldi, Kohler et al. 2007; Norton, Lou-Hing et al. 2008). Certaines GSTs interviennent également directement ou indirectement dans la protection, la limitation et/ou la réparation des dommages causés par des stress tels que l'infection par des microorganismes, les écarts thermiques ou encore la pollution aux métaux lourds (Marrs 1996). Les stress s'accompagnant d'une augmentation du niveau d'EORs dans les cellules entraînent l'induction de gènes codant des GSTs. Néanmoins, si leurs rôles ne sont pas encore

totalement élucidés, plusieurs fonctions catalytiques rapportées pour les GSTs pourraient traduire leur implication *in vivo*. Une des premières fonctions concerne notamment l'activité peroxydase décrite pour certaines isoformes. En effet, les GSTs appartenant aux classes Alpha, Mu, Thêta, Zêta, Phi et Delta, pour ne citer que certaines classes, sont capables de réduire des peroxydes de natures variées. Toutefois, ces enzymes ne présentent pas toutes les mêmes spécificités de substrats et leur implication n'est principalement caractérisée qu'*in vitro* (Tang and Tu 1994; Marrs 1996; Hurst, Bao et al. 1998; Frova 2006). Cette activité de type peroxydase concerne la réduction enzymatique d'hydroperoxydes tels que H_2O_2, et d'hydroperoxydes d'acides gras et d'acides nucléiques. Ces deux deniers types de molécules sont notamment générés lors d'un stress oxydant *in vivo* par, respectivement, l'oxydation non contrôlée des membranes cellulaires et de l'ADN/ARN. Chez le tabac, la surexpression d'un gène hétérologue codant une GSTs Tau présentant une forte activité peroxydase rend les plants de tabac plus résistants aux stress salin et thermique (Roxas, Smith et al. 1997). La protection vis-à-vis du stress oxydant peut également être indirecte. En effet, bien que certaines GSTs ne présentent pas d'activité peroxydase, elles interviennent tout de même dans la régulation de ce type de stress. Par exemple, des GSTs de la classe Alpha sont capables de glutathionyler des composés hautement toxiques et réactifs qui provoquent la fragmentation de l'ADN génomique, notamment le 4-hydroxynonenal impliqué dans la maladie d'Alzheimer, le diabète, le cancer ou la mort cellulaire par nécrose. Ce composé, résultant d'une peroxydation lipidique en chaîne non contrôlée, est neutralisé par glutathionylation puis dégradé hors de la cellule en acide mercapturique (Figure 58) (Winter, Segall et al. 1987; Petras, Siems et al. 1995; Hubatsch, Ridderstrom et al. 1998; Singh, Coronella et al. 2001; Balogh and Atkins 2011).

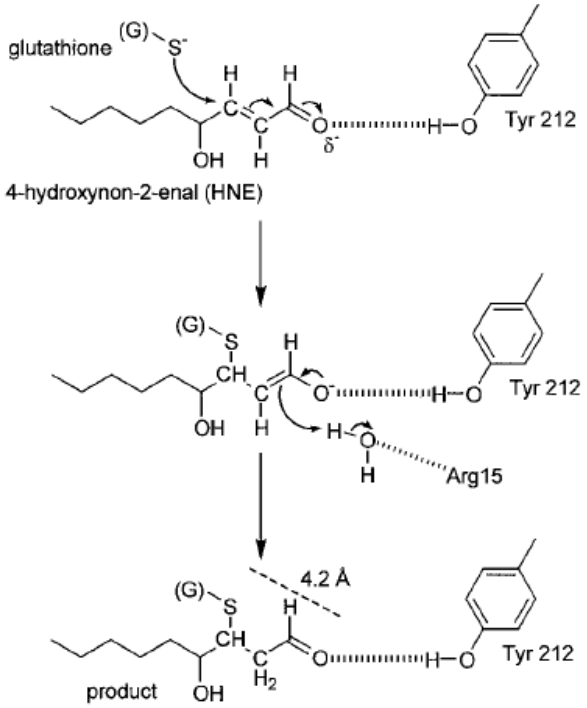


Figure 58 : Mécanisme de détoxication du 4-hydroxynonenal (HNE) par glutathionylation (Bruns, Hubatsch et al. 1999).

La stabilisation du HNE dans le site actif permet son attaque par l'anion thiolate du glutathion. L'adduit glutathionylé sera relargué du site actif puis exporté hors de la cellule où il sera dégradé en acide mercapturique.

Certaines GSTs Tau et Oméga semblent également impliquées vis-à-vis de stimuli générant un stress oxydant. En effet, les GSTs Tau sont surexprimées chez le riz lors d'une surexposition à l'arsenic et les GSTs Oméga présentent une activité réductrice *in vitro* de dérivés d'arsenic. Ces molécules réactives sont connues pour découpler la chaîne respiratoire et attaquer les groupements thiols des protéines (Zakharyan and Aposhian 1999; Zakharyan, Sampayo-Reyes et al. 2001; Aposhian, Zakharyan et al. 2004; Norton, Lou-Hing et al. 2008). Enfin, chez le persil, des GSTs sont responsables de la biosynthèse de flavonoïdes antioxydants lors d'expositions aux rayons ultraviolets. Ces GSTs permettent notamment l'induction des gènes codant l'enzyme clé de leur voie de biosynthèse, la chalcone synthase (Loyall, Uchida et al. 2000).

4. La déglutathionylation

Les GSTs à cystéine catalytique ne sont pas ou peu capables de catalyser des réactions de transfert de glutathion, d'isomérisation et de type peroxydase, mais possèdent en revanche des caractéristiques biochimiques propres qui se rapprochent des glutarédoxines. Parmi ces GSTs, seules celles appartenant à la classe Bêta présentent de très faibles activités de type

peroxydase et de conjugaison du glutathion. En effet, le groupement thiol des cystéines permet à ces GSTs de réaliser des attaques nucléophiles. Ainsi, à l'instar des glutarédoxines, ces GSTs fonctionnent *in vitro* en tant que thiol-transférases et réductases sur des substrats tels que l'hydroxyéthyl disulfide (HED) et le DHA (Ishikawa, Casini et al. 1998; Caccuri, Antonini et al. 2002; Dixon, Davis et al. 2002; Whitbread, Masoumi et al. 2005; Allocati, Federici et al. 2008). Néanmoins, la réduction de ces deux substrats nécessite un intermédiaire glutathionylé qui se forme spontanément en présence de glutathion réduit. L'attaque nucléophile, réalisée par ces GSTs, consiste en la rupture de la liaison covalente liant le glutathion au substrat. La cystéine catalytique de l'enzyme se retrouve impliquée dans un pont disulfure avec la molécule de glutathion et sera régénérée suite à l'attaque d'une seconde molécule de glutathion. Si la réduction du HED consiste en la réduction d'un pont disulfure (liaison S-S), celle du recyclage de l'ascorbate fait intervenir une liaison carbone-soufre (liaison S-C). Partant de cette capacité à rompre les liaisons carbone-soufre, d'autres molécules glutathionylées plus ou moins complexes ont été identifiées et la capacité de déglutathionylation des GSTs à cystéine catalytique clairement mise en évidence. En effet, ces enzymes semblent impliquées dans différentes voies du métabolisme secondaire en catalysant des réactions de déglutathionylation. Par exemple, chez les plantes, les DHARs sont très efficaces dans le recyclage de l'ascorbate. Les GSTs Lambda d'Arabidopsis peuvent, quant à elles, déglutathionyler la quercétine, molécule antioxydante, et semblent ainsi impliquées dans le recyclage des flavonoïdes oxydés (Figure 59) (Dixon and Edwards 2010). Chez les bactéries et les champignons, les GSTs de la classe GHR interviennent dans l'élimination des (poly)chloroquinones toxiques présentes dans l'environnement et les GSTs LigG permettent la dégradation de la lignine par déglutathionylation de l'intermédiaire réactionnel ayant permis le clivage de la liaison β-aryl-éther (Figure 59) (Masai, Ichimura et al. 2003; Huang, Xun et al. 2008; Xun, Belchik et al. 2010). Chez les animaux, les dérivés d'acétophénones sont déglutathionylés par les GSTs de la classe Oméga (Board and Anders 2007; Board, Coggan et al. 2008). Les GSTs à cystéine catalytique sont donc en général capables de catalyser des réductions glutathion-dépendantes sur des substrats très divers. En revanche, si la fonction des GSTs de la classe DHAR semble clairement établie, la fonction des autres GSTs à cystéine catalytique n'est pas encore élucidée.

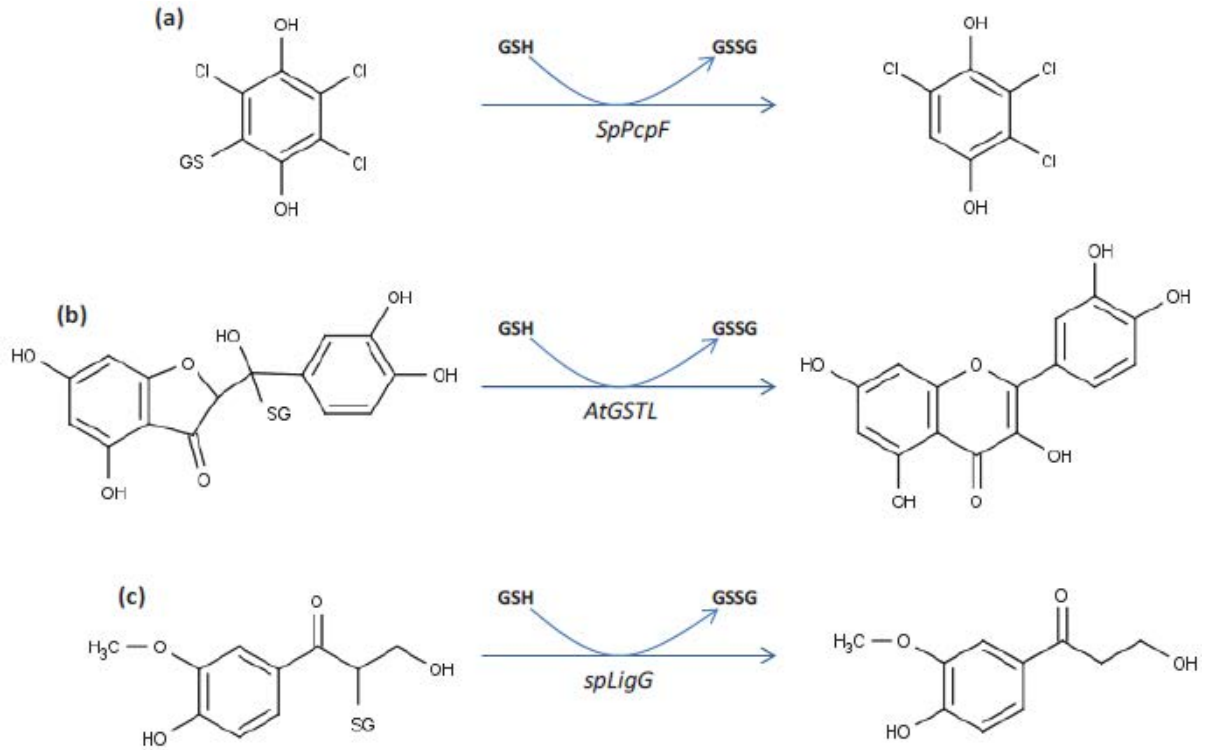


Figure 59 : Exemples de molécules déglutathionylées par des GSTs à cystéine catalytique.
Les GSTs à cystéine catalytique sont impliquées dans des réactions de déglutathionylation. Les GHRs et les GSTLs permettent respectivement la déglutathionylation du pentachlorophénol (a) et de la quercétine (b). Les GSTs de la classe LigG sont, quant à elles, impliquées dans la déglutathionylation du produit ayant permis le clivage de la liaison β-aryl-éther de la lignine (c). Sp, *Sphingobium chlorophenolicum* ; At, *Arabidopsis thaliana*.

5. L'activité ligandine, fonction non catalytique des GSTs

Enfin, certaines GSTs possèdent des fonctions non catalytiques, dites ligandines, par leur capacité à lier divers ligands uniquement pour leur transport et/ou leur stockage. Cette capacité de liaison a été démontrée pour certaines GSTs et pour une grande variété de molécules telle la bilirubine, les hèmes ou encore les stéroïdes (Litwack, Ketterer et al. 1971; Ketterer, Coles et al. 1983). Ainsi, les GSTs de la classe Alpha peuvent lier efficacement la bilirubine alors que les GSTs de la classe Mu transportent les hèmes de la mitochondrie vers les apo-cytochromes b5 (Kamisaka, Habig et al. 1975; Senjo, Ishibashi et al. 1985). Certaines GSTs de plantes sont également capables de fixer des ligands hydrophobes de nature et de structure variées comme les porphyrines, les flavonoïdes, les cytokinines et l'auxine (Smith, Nourizadeh et al. 2003; Dixon, Lapthorn et al. 2008). Cette fixation permet une régulation métabolique des processus sous-jacents ou un export vers la vacuole de ces composés (Mueller, Goodman et al. 2000; Dixon, Lapthorn et al. 2008). Des études structurales ont mis en évidence qu'un site de liaison, différent des sites G et H et appelé site L, est retrouvé à

l'interface de dimérisation des GSTs dimériques (Figure 60) (McTigue, Williams et al. 1995; Ji, von Rosenvinge et al. 1996; Sampayo-Reyes and Zakharyan 2006; Allocati, Federici et al. 2009; Brock, Board et al. 2013). Les fortes variations de ce motif entre les différentes classes de GSTs semblent rendre compte des variations dans la reconnaissance des ligands. Par exemple, l'hydrophilie et l'agencement structural de l'interface de dimérisation des GSTs Bêta permet de lier certains antibiotiques. Cette propriété serait ainsi responsable de la résistance de certaines bactéries vis-à-vis de ces composés (Allocati, Federici et al. 2009). Néanmoins, cette fonction ligandine n'est pas obligatoirement située au niveau de l'interface de dimérisation des GSTs. En effet, pour les GSTs de la classe FuA, ce site L se situe au sein du site catalytique, entre les sites G et H (Mathieu, Prosper et al. 2012). Bien que la position de ce site soit pour l'instant spécifique à cette classe, il devient important de considérer d'autres sites potentiels de fixation des ligands, notamment pour les GSTs monomériques. Dans la majorité des cas, la fonction exacte de cette propriété ligandine des GSTs n'est pas encore déterminée, mais cette fonction pourrait permettre de réguler certains processus cellulaires, de limiter les dommages engendrés par des composés toxiques et/ou de transporter certaines molécules à l'instar de l'albumine chez l'Homme (Litwack, Ketterer et al. 1971; Tipping, Ketterer et al. 1978; Axarli, Rigden et al. 2004).

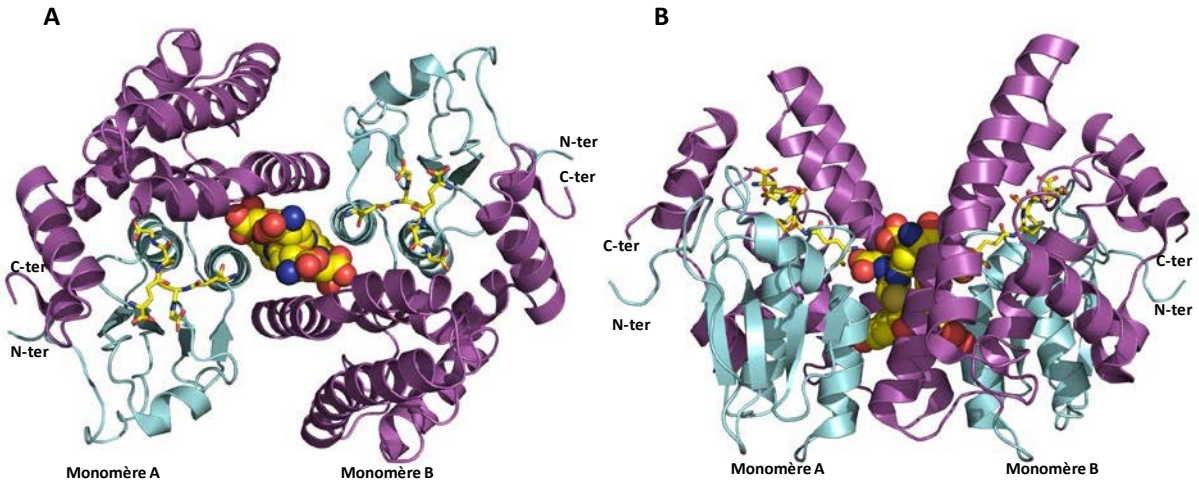


Figure 60 : Représentation du site ligandine des GSTs Oméga.
Les représentations tridimensionnelles de la GSTO1 humaine ont été générées à l'aide du logiciel Pymol et du code PDB : 4IS0. Les motifs thiorédoxines et hélicoïdaux sont représentés respectivement en cyan et en violet. Le S-(4-nitrophénacyl)glutathion est fixé dans le site ligandine à l'interface de dimérisation. Il est représenté en mode sphères. Le glutathion oxydé est représenté en bâtonnets.

Problématique et objectifs

Problématique et objectifs

Au cours des dernières années, la classification des GSTs a constamment évolué, notamment en raison de l'accumulation de nouvelles données issues du séquençage de nombreux génomes. De plus, avec le nombre croissant d'études biochimiques et structurales, il est devenu clair que certaines GSTs nouvellement identifiées ne pouvaient pas être regroupées avec les classes identifiées jusque-là. C'est notamment le cas de certaines Cys-GSTs qui, au lieu de présenter une activité de glutathionylation, catalysent plutôt la réaction inverse dite de déglutathionylation (Board and Anders 2007; Dixon and Edwards 2010; Dixon and Edwards 2010; Xun, Belchik et al. 2010; Meux, Prosper et al. 2011). Préalablement à ce travail de thèse, seules les Cys-GSTs des classes Lambda et DHAR avaient été identifiées et caractérisées au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel chez les organismes photosynthétiques (Dixon, Davis et al. 2002) (Dixon and Edwards 2010). Or, l'analyse *in silico* du génome du peuplier et d'autres espèces de plantes terrestres indiquait l'existence de séquences codant pour des GHRs et mPGES2s.

Alors que la fonction des DHARs semble exclusivement liée à la régénération par réduction du déshydroascorbate en ascorbate, les fonctions portées par les GSTs Lambda demeurent encore obscures à l'heure actuelle bien qu'il semblerait qu'elles soient potentiellement impliquées dans le métabolisme et/ou le transport de flavonoïdes (Dixon and Edwards 2010). D'un point de vue fonctionnel, ces enzymes peuvent catalyser une grande variété de substrats par des réactions de déglutathionylation (quinones, acétophénone, quercétine), de réduction d'espèces méthylées de l'arsenic comme démontré pour les GSTOs humaines, ou encore d'activités thiol-transférases (Board, Coggan et al. 2000; Zakharyan, Sampayo-Reyes et al. 2001; Board and Anders 2007; Dixon and Edwards 2010; Meux, Prosper et al. 2011). Concernant les GHRs, les isoformes bactériennes et fongiques caractérisées jusqu'ici sont impliquées dans le catabolisme des quinones chlorées et dans la dégradation de la lignine du bois au travers de la déglutathionylation de produits intermédiaires (Reddy and Gold 2001; Masai, Ichimura et al. 2003; Huang, Xun et al. 2008; Meux, Prosper et al. 2011). Globalement, les fonctions des Cys-GSTs et des GSTs en général dans le métabolisme secondaire sont peu documentées par rapport à celles des cytochrome P450 monooxygénases ou à leurs implications dans la détoxication des xénobiotiques.

Ces travaux de thèse se sont déroulés au sein de l'UMR 1136 - Interactions Arbres/Micro-organismes, dans l'équipe « Réponse aux stress et régulation redox » et s'inscrivent dans l'étude des relations structure-fonction de protéines impliquées dans la détoxication cellulaire, notamment lors de stress oxydant chez les organismes photosynthétiques. Les objectifs de cette thèse avaient pour but d'identifier puis de caractériser, à différents niveaux, des protéines appartenant aux Cys-GSTs puisque les connaissances tant biochimiques, structurales que physiologiques étaient très limitées. L'étude de ces GSTs a été réalisée en utilisant le peuplier et plus particulièrement *Populus trichocarpa*, arbre modèle du laboratoire. Le peuplier est une espèce très répandue en Europe devenue indispensable au maintien de nombreux biotopes. De par la croissance rapide de cet arbre (plusieurs mètres par an) et sa bonne qualité de bois, la populiculture a été favorisée en foresterie et en horticulture depuis le milieu du 19ème siècle en France. La France est ainsi le 2ème producteur au monde (environ 240 000 ha en surface plantée) derrière la Chine et le premier producteur et exportateur en Europe. Le bois de peuplier est utilisé pour de nombreuses applications industrielles. Il sert notamment à la fabrication d'emballages légers, de contreplaqués, ou encore à l'industrie papetière. En plus de sa valeur économique, le peuplier s'impose aujourd'hui comme une espèce modèle pour la génomique des arbres forestiers, de par ses caractéristiques biologiques et les ressources génomiques disponibles. Son cycle de reproduction est relativement court pour un arbre forestier (6 à 10 ans), la multiplication végétative ainsi que les croisements entre espèces sont bien maitrisés. Du point de vue de la génomique, plusieurs banques d'ESTs (expressed sequence tag) sont disponibles et son génome a été le premier génome d'arbre séquencé (Tuskan, Difazio et al. 2006).

Afin de mieux cerner et de mieux comprendre les rôles et les fonctions de ces protéines chez les plantes terrestres, j'ai entrepris la caractérisation de GSTs à cystéine catalytique appartenant à chacune des classes identifiées en combinant des approches de biochimie, de biologie moléculaire et cellulaire ainsi que des approches de biologie structurale (Figure 61). Avant de débuter cette analyse structure-fonction, les premiers travaux entrepris ont consisté à dresser une liste exhaustive des GSTs au sein de la lignée verte puis d'en établir la phylogénie. Par la suite, les Cys-GSTs recensées, représentées par 4 classes de GSTs (Lambda, DHAR, GHR et mPGES2) chez *P. trichocarpa* ont été sélectionnées, produites puis purifiées en système hétérologue bactérien. Les protéines recombinantes purifiées ont alors été caractérisées non seulement au niveau biochimique par l'utilisation de différents tests enzymatiques mais aussi au niveau structural. Parallèlement à

ces travaux, les patrons d'expression tissulaire des gènes ainsi que la localisation subcellulaire de ces protéines ont été déterminés. Enfin, une stratégie basée sur la compétition de substrats potentiels vis-à-vis d'une sonde fluorescente spécifique du site actif des GSTs à cystéine catalytique a été développée dans l'objectif d'aboutir à l'identification de substrats potentiels de ces enzymes et à la fonction physiologique précise de ces protéines. Les principaux résultats obtenus au cours de ces travaux sur les GSTLs et les GHRs sont présentés sous la forme de plusieurs articles publiés ou en révision.

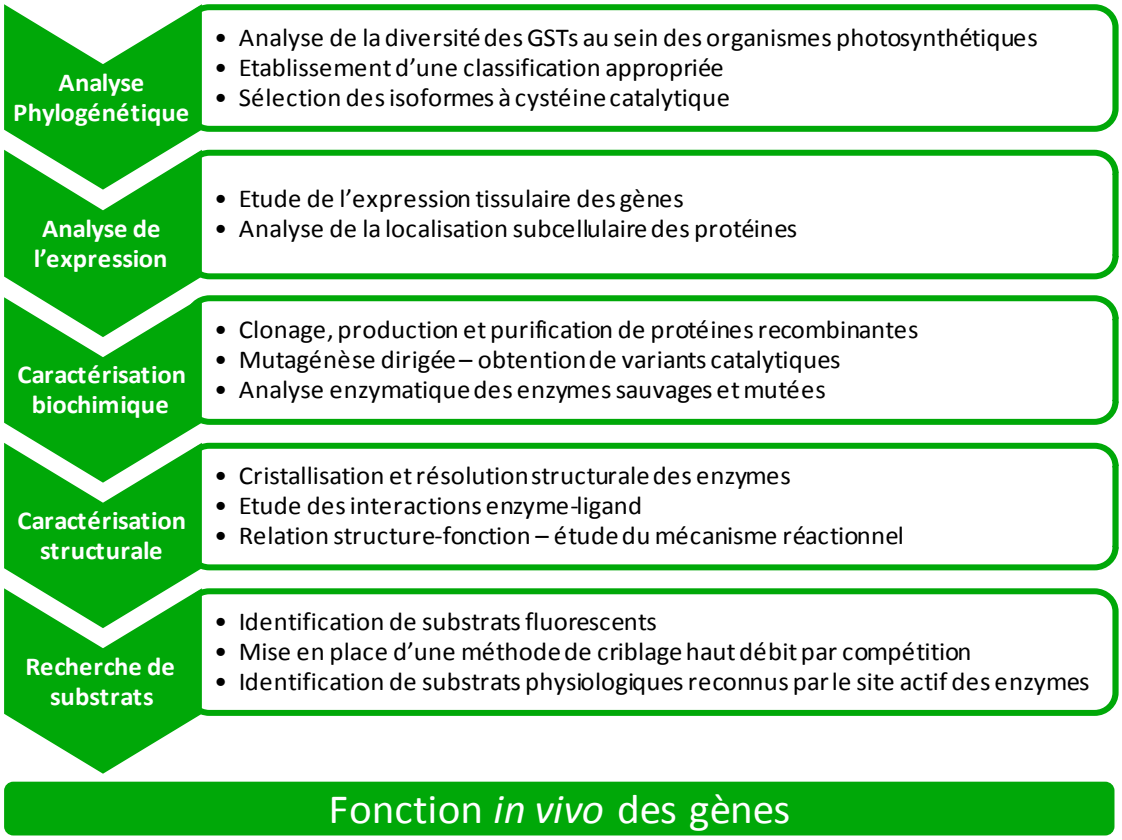


Figure 61 : Stratégie d'étude des GSTs à cystéine catalytique chez le peuplier *Populus trichocarpa*.

Résultats

Résultats

1. Article 2 : The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants

Pierre-Alexandre Lallement, Bastiaan Brouwer, Olivier Keech, Arnaud Hecker et Nicolas Rouhier

Frontiers in Pharmacology, 2014, **5**, **192**

Préalablement à ce travail de thèse, l'analyse des génomes *d'Arabidopsis thaliana* et de *P. trichocarpa* avait permis d'établir une phylogénie des membres de la superfamille des GSTs retrouvés chez chacun de ces organismes. A l'époque, les membres constituant cette superfamille (60 chez *A. thaliana* et 81 chez *P. trichocarpa*) étaient regroupés en au moins 6 classes : Phi, Tau, DHAR, Lambda, Thêta et Zêta. Parmi les GSTs à cystéine catalytique, seules les classes Lambda et DHAR avaient été identifiées, les autres classes Phi, Tau, Thêta et Zêta correspondant à des GSTs à sérine catalytique. Avant de se lancer dans une étude structure-fonction plus approfondie des Cys-GSTs, il était primordial d'identifier de façon exhaustive les gènes codant ces isoformes chez les organismes de la lignée verte dont les génomes étaient séquencés. Ce travail, qui n'avait en effet jamais été effectué auparavant, avait pour objectifs d'obtenir une vision complète de la distribution de ces gènes/protéines chez les plantes et de proposer une classification adéquate. Les GSTs canoniques peuvent être ainsi regroupées en 14 classes différentes, les Cys-GSTs constituant 6 classes : mPGES2, GHR, Iota, Hémérythrine, Lambda et DHAR. Cette étude a ainsi permis de déterminer la répartition des classes au sein des organismes photosynthétiques, par exemple les GSTs Iota et Hémérythrine ne sont présentes que chez les algues, les bryophytes et les lycophytes alors que les GSTLs sont rencontrées uniquement chez les plantes terrestres. Un autre volet de cette étude a notamment porté sur l'analyse *in silico* de l'expression des gènes codant les Cys-GSTs d'*A. thaliana* tant au niveau dévelopemental qu'en réponse à des contraintes (température, sécheresse, salinité, hypoxie, lumière, déficience en fer et en azote et stress biotiques et chimiques). Dans ce contexte, cette analyse a permis de compiler les données concernant les propriétés fonctionnelles et structurales de ces GSTs et a contribué à la mise à jour de la classification des GSTs chez les plantes.

frontiers in
PHARMACOLOGY

REVIEW ARTICLE
published: 20 August 2014
doi: 10.3389/fphar.2014.00192

The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants

Pierre-Alexandre Lallement[1,2], Bastiaan Brouwer[3], Olivier Keech[3], Arnaud Hecker[1,2] and Nicolas Rouhier[1,2]*

[1] UMR1136, Interactions Arbres - Microorganismes, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
[2] UMR1136, Interactions Arbres - Microorganismes, INRA, Champenoux, France
[3] Department of Plant Physiology, Umeå Plant Science Centre, Umeå University, Umeå, Sweden

Edited by:
Alfonso Pompella, Università di Pisa, Italy

Reviewed by:
Rahman M. Mizanur, US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, USA
Antonio Masi, University of Padova, Italy

****Correspondence:***
Nicolas Rouhier, UMR1136, Interactions Arbres - Microorganismes, Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine, Boulevard des aiguillettes, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
e-mail: nicolas.rouhier@univ-lorraine.fr

Glutathione transferases (GSTs) represent a widespread multigenic enzyme family able to modify a broad range of molecules. These notably include secondary metabolites and exogenous substrates often referred to as xenobiotics, usually for their detoxification, subsequent transport or export. To achieve this, these enzymes can bind non-substrate ligands (ligandin function) and/or catalyze the conjugation of glutathione onto the targeted molecules, the latter activity being exhibited by GSTs having a serine or a tyrosine as catalytic residues. Besides, other GST members possess a catalytic cysteine residue, a substitution that radically changes enzyme properties. Instead of promoting GSH-conjugation reactions, cysteine-containing GSTs (Cys-GSTs) are able to perform deglutathionylation reactions similarly to glutaredoxins but the targets are usually different since glutaredoxin substrates are mostly oxidized proteins and Cys-GST substrates are metabolites. The Cys-GSTs are found in most organisms and form several classes. While Beta and Omega GSTs and chloride intracellular channel proteins (CLICs) are not found in plants, these organisms possess microsomal ProstaGlandin E-Synthase type 2, glutathionyl hydroquinone reductases, Lambda, Iota and Hemerythrin GSTs and dehydroascorbate reductases (DHARs); the four last classes being restricted to the green lineage. In plants, whereas the role of DHARs is clearly associated to the reduction of dehydroascorbate to ascorbate, the physiological roles of other Cys-GSTs remain largely unknown. In this context, a genomic and phylogenetic analysis of Cys-GSTs in photosynthetic organisms provides an updated classification that is discussed in the light of the recent literature about the functional and structural properties of Cys-GSTs. Considering the antioxidant potencies of phenolic compounds and more generally of secondary metabolites, the connection of GSTs with secondary metabolism may be interesting from a pharmacological perspective.

Keywords: cysteines, deglutathionylation, glutathione transferases, photosynthetic organisms, phylogeny

INTRODUCTION

Glutathione is a tripeptide with the sequence γGlu-Cys-Gly that is mostly present in reduced (GSH) or disulfide (GSSG) forms, even though nitrosoglutathione (GSNO) may represent another important source. Under physiological conditions, free glutathione is present in concentrations ranging from 1 to 10 mM with the reduced form largely predominating over the oxidized form (Gutscher et al., 2008; Pallardo et al., 2009). As such, glutathione is the major non-protein thiol source in eukaryote cells, likely constituting a crucial redox buffer (Rouhier et al., 2008). Glutathione can also fulfill additional roles. In eukaryotes, glutathione is essential for a proper development, controlling in particular cell-cycle progression. Apart from development, glutathione is crucial for stress response by (i) neutralizing radicals, (ii) participating in heavy metal tolerance, either directly or as a constitutive element of phytochelatins, (iii) contributing to the regeneration of antioxidant molecules such as ascorbate and α-tocopherol, and (iv) providing electrons and protons to glutathione transferases (GSTs) or to peroxiredoxins, both with and without the involvement of glutaredoxins (Grxs) for peroxide removal (Rouhier et al., 2008). While the exact role of glutathione has not been completely defined, it is clear that, depending on its redox state, glutathione can react with various intracellular molecules and that glutathionylation/deglutathionylation reactions of both proteins and smaller compounds are central to GSH functions. Protein glutathionylation is a reversible post-translational modification that is now recognized as a major signaling or protective mechanism. It occurs under basal non-stress conditions but has mostly been documented in response to oxidative stress conditions (Zaffagnini et al., 2012). The reversible reaction i.e., deglutathionylation, occurs either by the intervention of Grxs or by direct thiol/disulfide exchange reactions with GSH once an appropriate GSH/GSSG ratio has been restored.

In addition to proteins, glutathionylation of metabolites has also attracted a lot of attention as it constitutes an intermediate step in a number of metabolic processes and detoxification pathways. It has been well-established that most organisms possess a three-step detoxification system to eliminate endogenous and exogenous toxic compounds (Coleman et al., 1997; Morel et al., 2013). In the first step, enzymes such as cytochrome P450 monooxygenases catalyze various reactions (oxidation, reduction or hydrolysis) to expose or introduce a functional moiety on hydrophobic substrates. In the second step, conjugating enzymes perform addition reactions (e.g., acetyl, methyl, glucuronic acid) on these newly modified, electrophilic substrates. The glutathione addition onto electrophilic molecules is well-recognized and is mediated by specific classes of GSTs having usually a serine or a tyrosine as a catalytic residue. Finally, glutathionylated products are either exported from the cells or sequestered in vacuoles. In plants, GSTs have been identified by showing glutathionylation of the herbicide atrazine (Lamoureux et al., 1970). Most subsequent studies have focused on these GST types that are here referred to as glutathionylating GSTs, although other biochemical activities have been described for some GST classes. To cite a few, numerous GSTs exhibit GSH-dependent peroxidase activities reducing simple peroxides but also organic hydroperoxides (Tang and Tu, 1994; Marrs, 1996; Hurst et al., 1998). Theta GSTs were shown to catalyze the isomerization of maleylacetoacetate into fumarylacetoacetate, a key component of the catabolism of tyrosine and phenylalanine (Thom et al., 2001; Fernandez-Canon et al., 2002). Besides these catalytic functions, GSTs could also exhibit ligandin functions, binding hydrophobic substrates in a so-called L-site for transport and storage purposes. In plants, it has been documented that GSTs with ligandin properties are not only implicated in the transport of anthocyanins and flavonoids but also of hormones such as auxin and cytokinin, which suggests a possible role in cell signaling (Smith et al., 2003; Kitamura et al., 2004; Moons, 2005).

With the increasing number of biochemical studies, it became clear that several GSTs do not have a glutathionylation activity but instead catalyze the opposite reaction; deglutathionylation (Dixon and Edwards, 2010a,b; Xun et al., 2010; Board, 2011; Meux et al., 2011). This capacity usually originates from the replacement of the catalytic serine or tyrosine residues in the active site motif by a cysteinyl residue as demonstrated for mammalian, insect and fungal Omega GSTs (GSTOs) (Board et al., 2000; Kim et al., 2006; Yamamoto et al., 2009; Meux et al., 2013), for plant Lambda GSTs (GSTLs) (Dixon and Edwards, 2010b; Lallement et al., 2014) and for bacterial and fungal glutathionyl hydroquinone reductases (GHRs) (Xun et al., 2010; Meux et al., 2011). However, the physiological functions of these enzymes have rarely been elucidated. Human GSTOs may be involved in arsenic biotransformation, reducing methyl and dimethyl arsenate (Zakharyan et al., 2001; Burmeister et al., 2008), whereas plant GSTLs may be involved in flavonoid metabolism and/or trafficking (Dixon and Edwards, 2010b). Interestingly, while the role of GSTs has classically been associated to the modification of small molecules and the role of glutaredoxins to the deglutathionylation of proteins, it has recently been shown that human GSTO1-1 can deglutathionylate β-actin, which should prompt us to consider proteins as GST substrates (Menon and Board, 2013). Concerning GHRs, the bacterial and fungal members characterized so far are involved in the catabolism of chlorinated quinones and in lignin degradation through the deglutathionylation of glutathionylated intermediates (Reddy and Gold, 2001; Masai et al., 2003; Huang et al., 2008; Meux et al., 2011). While these glutathionylated compounds constitute intermediates in catabolism pathways, they may also constitute intermediates for biosynthetic pathways as shown for sulfur-containing defense molecules such as camalexins or glucosinolates (Su et al., 2011). However, the roles of GSTs in the secondary metabolism are less documented compared to the ones of cytochrome P450 monooxygenases and to their involvement in xenobiotic detoxification. A plausible explanation is that intracellular GSH-conjugated compounds have rarely been successfully identified from plant extracts, possibly due to their transient nature or to the difficulty to isolate them. As examples, glutathionylated compounds have been identified as precursors of aromas in fruits (Fedrizzi et al., 2012; Peña-Gallego et al., 2012) or as conjugated oxylipins upon leaf infiltration of keto-fatty acids (Davoine et al., 2005).

Based on the biochemical properties of GSTs and their functional association with cytochrome P450 monooxygenases, acquiring fundamental knowledge about GST functions, regulation and substrates may be beneficial for diverse pharmaceutical and biotechnological applications. In biotechnology, the ability of some GSTs to catalyze GSH-conjugation reactions has been exploited not only for the development of sensitive biosensors or enzyme assays for the determination of the concentration of various pesticides and herbicides (Chronopoulou and Labrou, 2009) but also for the development of herbicide and stress-tolerant plants. Moreover, among the thousands of natural plant products, including polyphenols, flavonoids, alkaloids, and quinones, several molecules possess antimicrobial, anticarcinogenic, anti-inflammatory, or antioxidant properties (Lewis and Ausubel, 2006; Saleem et al., 2010) not to speak about unidentified or untested molecules. Although they are often relatively low abundant molecules, they also constitute a recognized source of molecules important for the cosmetic industry (fragrance) or for nutrition (gustatory perception/dietary complements) contributing to extend the color or aroma palette. For instance, GSTs, notably those from the Pi and Alpha classes, are known to be present in the olfactory epithelium and particularly in the covering mucus layer, where they would serve for metabolizing odorant molecules (Aceto et al., 1993; Debat et al., 2007). Overall, by recognizing and eventually modifying a wide range of antioxidant molecules, GSTs could represent promising enzymes in diagnosis and monitoring cancer invasion, liver, kidney, Alzheimer's and Parkinson's diseases (Chronopoulou and Labrou, 2009). They also have a considerable interest for isolating new secondary metabolites or for developing molecules (drugs or antimicrobial compounds) with different or improved pharmacological properties. As an example, Canfosfamide (TLK286, TELCYTA®), a cancer cell-activated prodrug, was designed to exploit the elevated levels and the activity of glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) that is overexpressed in many human cancer cells (Tew, 2005). Hence, GSTs could be useful for product transformation but also

for synthetic biology or metabolic engineering approaches, with the aim of generating new chemical entities.

Over the past years, the GST classification has constantly evolved, notably due to the increase of genomic data and to the presence of particular isoforms in a specific subset of organisms. The objective of this review is to present an overview of cysteine-containing GST (Cys-GST) classes in photosynthetic organisms by describing known data concerning the gene expression, the protein subcellular localization and their biochemical and structural properties.

THE GST FAMILY IN PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS

The present phylogenetic analysis focuses on photosynthetic organisms and as a basis uses the Cd00570 Sequence Cluster of the "conserved domains" tool in NCBI, which includes the GST classes that contain the typical N-terminal thioredoxin (Trx) domain found in GSTs. This cluster is part of the thioredoxin superfamily, among other well-known clusters such as thioredoxin, glutaredoxin, peroxiredoxin, protein disulfide isomerase (PDI), and disulfide bond A (DsbA) oxidoreductase to name a few. The main criterion used is *a minima* the presence of the two classical GST domains, the N-terminal thioredoxin-like domain with a β1α1β2α2β3β4α3 topology and a C-terminal all-helical domain, that together form a typical GST fold. For this reason, Kappa GSTs and mPGES-1 (microsomal ProstaGlandin E-Synthase type 1), one subclass of MAPEGs (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) (Bresell et al., 2005), enzymes often integrated into the GST superfamily, are not considered here, even though some terrestrial plants and algae possess at least one mPGES-1 representative. The phylogenetic analysis of all GSTs found in eukaryote photosynthetic organisms has been fitted to the aforementioned criterion, which allows identification of 14 classes (**Figure 1**). The sequences used were those present in model organisms including a gymnosperm: *Pinus tabulaeformis*, several angiosperms: *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, and *Hordeum vulgare*, a lycophyte: *Selaginella moellendorffii* and a moss: *Physcomitrella patens*.

Among these 14 classes, Tau, Phi, Zeta, Theta, and tetrachlorohydroquinone dehalogenase (TCHQD) classes clearly contain GSTs with a catalytic serine. The nature of the catalytic residue in the EF1Bγ and Ure2p classes is less clear, but RIRT and APNG motifs are found at a position similar to the active site signature in other GSTs. Finally, the seven other classes (Iota GSTs (GSTIs), Hemerythrin GSTs (GSTHs), Dehydroascorbate (DHA) reductases (DHARs), GSTLs, GHRs, mPGES-2s, and metaxins) contain members that clearly display a very conserved cysteine in the active site motif, hence suggesting that they belong to Cys-GSTs. Metaxins are part of the mitochondrial translocation system of the mitochondrial outer membrane, being anchored through their C-terminal region whereas the rest of the protein is oriented to the cytosol (Lister et al., 2007). However, they have not been integrated in this study. Indeed, although having the typical GST fold, none of the cysteine of the CPxC signature found in plant sequences is conserved in other organisms notably mammals, and there is no evidence for a cysteine involvement or for a requirement of GSH for their function.

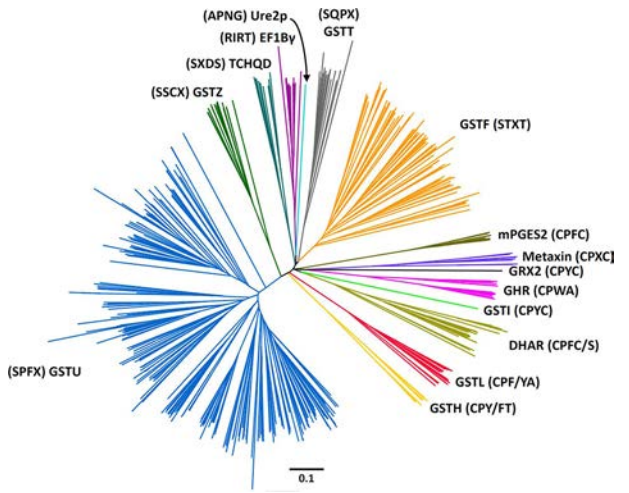


FIGURE 1 | Rooted phylogenetic tree of plant GSTs. The sequences used are those identified in *Arabidopsis thaliana* (Lan et al., 2009), *Hordeum vulgare* (Rezaei et al., 2013), *Oryza sativa* (Lan et al., 2009), *Physcomitrella patens* (Liu et al., 2013), *Pinus tabulaeformis* (Lan et al., 2013), *Populus trichocarpa* (Lan et al., 2009), and *Solanum lycopersicum* (Csiszar et al., 2014). Sequences were aligned with PROMALS3D and alignment manually adjusted with Seaview software (Gouy et al., 2010). The phylogenetic tree was constructed with BioNJ (Gascuel, 1997) in Seaview, rooted with *E. coli* glutaredoxin 2 and edited with Figtree software (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/). The robustness of the branches was assessed by the bootstrap method with 500 replications. Various classes can be distinguished: Dehydroascorbate reductase (DHAR), Elongation factor 1Bγ (EF1Bγ), Glutathionyl hydroquinone reductase (GHR), Phi (GSTF), Hemerythrin (GSTH), Iota (GSTI), Lambda (GSTL), Theta (GSTT), Tau (GSTU), Zeta (GSTZ), Microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES-2), Tetrachloro-hydroquinone dehalogenase (TCHQD), and Ure2p. The scale marker represents 0.1 substitutions per residue. For clarity, the names of the sequences have not been indicated but all sequences are available in the Supplementary Material.

Concerning mPGES-2s, they were initially not considered as GSTs because GSH was not absolutely required for the detected activity e.g., the isomerization of ProstaGlandin H_2 (PGH_2) (Tanikawa et al., 2002) and because they exhibited a low similarity with GSTs identified at that time. However, based on (i) its typical GST structure, (ii) the identification of another activity strictly requiring GSH, and (iii) the identification of additional more closely related Cys-GSTs (Yamada et al., 2005; Takusagawa, 2013), mPGES-2s do in fact belong to the GST family. It is worth mentioning that Beta GSTs (GSTBs) and GSTOs as well as chloride intracellular channel proteins (CLICs), which belong to Cys-GSTs, are not found in plants. Moreover, particular proteins that are listed as putative GST members under the name "2-GST_N" have not been considered here. Although they have two repeated N-terminal Trx domains and a quite conserved CPFC motif in one of them, they lack the C-terminal domain. Since the GSTI and GSTH isoforms have not yet been characterized, we have essentially focused the following parts on the four remaining Cys-GST classes, describing in detail the current knowledge on DHAR, GHR, GSTL and mPGES-2 enzymes.

DISTRIBUTION OF CYSTEINYL GSTs IN PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS: GENE CONTENT, STRUCTURE, AND ORGANIZATION

After retrieving all Cys-GST sequences present in representative cyanobacterial and algal genomes as well as in all completely sequenced terrestrial plant genomes, a comparative genomic analysis was performed to get an accurate classification of Cys-GSTs in the green lineage. The resulting phylogenetic tree confirmed six major clades corresponding to the 6 earlier defined classes (**Figure 2**). In previous phylogenetic analyses conducted with other gene families of the thioredoxin superfamily, e.g., thioredoxins, glutaredoxins, peroxiredoxins and PDIs, the gene structure (number of exons in eukaryotic genes) was conserved and coherent with the classes (Meyer et al., 2002; Rouhier and Jacquot, 2005; Rouhier et al., 2006; Selles et al., 2011). Here, the gene structure was not informative as it was not at all conserved among species, even the phylogenetically close ones.

The DHAR class is essentially present in terrestrial plants. Indeed, this class is absent in cyanobacteria and a single gene, that likely represents the ancestor DHAR gene, is found in a few algae of the chlorophyceae and trebouxiophyceae classes but not in prasinophyceae. The number of DHAR genes in a given species usually lies between 2 and 3 (**Table 1**). For species possessing a higher number of genes, the increase is not due to tandem duplication as the genes are neither found at adjacent positions nor on the same chromosome in most cases. In our chosen well-annotated reference genomes, there are two genes in *O. sativa* and *S. moellendorffii* and three in *A. thaliana*, *P. trichocarpa*, and *P. patens*. DHARs are split in two well-differentiated subgroups, the genes coding for chloroplastic proteins (CPFC active site motif) and those coding for proteins that are likely all cytosolic (CPFS active site motif) (**Figure 2**) with algal sequences being dispersed but on the same branch. Since algal genes code for proteins that are devoid of targeting sequences, the ancestral gene might be the one coding for the cytosolic members. Among terrestrial plants, all organisms have at least one member in each clade.

GSTLs appear unique to terrestrial plants, the number of genes ranging generally from 2 to 4 with the exception of *S. moellendorffii*, where the gene seems absent (**Table 1**). In *A. thaliana*, two genes (*AtGSTL1* and *AtGSTL2*) are repeated in tandem on the chromosome 5, likely indicating a recent duplication event. On the other hand, specific expansions have arisen in some species such as *Aquilegia coerulea*, *Malus domestica*, *Eucalyptus grandis*, and *Panicum virgatum* which have 5–8 genes. In this case, some events of tandem duplication have largely contributed to this increase. This is particularly true in *Eucalyptus grandis*, a species in which there are two gene clusters, one having a series of four

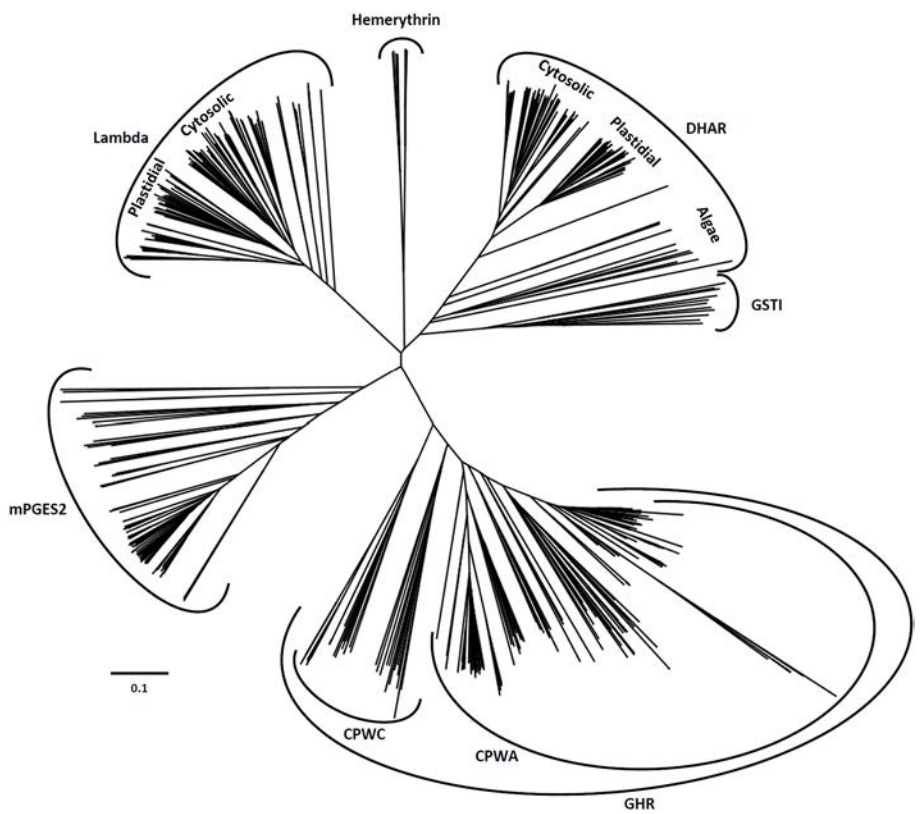


FIGURE 2 | Unrooted phylogenetic tree of Cys-GSTs present in the green lineage. Sequences were aligned with PROMALS3D using 1Z9H, 3PPU, and 4PQH PDB structures as templates. Then the alignment has been manually adjusted with Seaview software. The phylogenetic tree was constructed with BioNJ and edited with Figtree software (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/). The robustness of the branches was assessed by the bootstrap method with 500 replications. The scale marker represents 0.1 substitutions per residue. For clarity, the names of the sequences have not been indicated but all sequences are available in the Supplementary Material.

Table 1 | Cys-GST gene content in sequenced chlorophytes and embryophytes.

	DHAR	GHR	GSTL	mPGES-2	GSTI	GSTH	Total
VIRIDIPLANTAE							
Chlorophyte							
Chlamydomonas reinhardtii v5.5	1	3	0	1	1	0	6
Chlorella sp. NC64A	1	2	0	1	1	0	5
Coccomyxa subellipsoidea C-169 v2.0	2	2	0	1	1	0	6
Micromonas pusilla CCMP1545 v3.0	0	2	0	1	1	0	4
Micromonas pusilla RCC299 v3.0	0	2	0	1	1	0	4
Ostreococcus lucimarinus v2.0	0	1	0	1	1	0	3
Volvox carteri v2.0	1	0	0	1	1	0	3
Embryophyte							
Physcomitrella patens v3.0	3	2	1	2	1	8	17
Tracheophyte							
Selaginella moellendorffii v1.0	2	5	0	1	1	2	11
Angiosperm							
Grass							
Brachypodium distachyon v1.2	2	2	2	1	0	0	7
Oryza sativa v7.0	2	2	3	1	0	0	8
Panicum virgatum v1.1	3	3	6	1	0	0	13
Setaria italica v2.1	2	2	4	1	0	0	9
Sorghum bicolor v2.1	3	2	4	1	0	0	10
Zea mays 6a	4	7	4	1	0	0	16
Eudicot							
Aquilegia coerulea v1.1	2	2	6	1	0	0	11
Pentapetalae							
Mimulus guttatus v2.0	2	2	3	2	0	0	9
Solanum lycopersicum iTAG2.3	2	2	5	1	0	0	10
Solanum tuberosum v3.4	2	2	3	2	0	0	9
Vitis vinifera Genoscope.12X	2	1	4	2	0	0	9
Rosid							
Poplar-Malvidae							
Eucalyptus grandis v1.1	3	3	8	3	0	0	17
Populus trichocarpa v3.0	3	2	3	3	0	0	11
Brassicales-Malvales							
Carica papaya ASGPBv0.4	2	0	2	1	0	0	5
Gossypium raimondii v2.1	3	2	3	2	0	0	10
Theobroma cacao v1.1	2	3	2	2	0	0	9
Brassicaceae							
Arabidopsis lyrata v1.0	3	4	2	1	0	0	10
Arabidopsis thaliana TAIR10	3	4	3	1	0	0	11
Boechera stricta v1.2	3	4	3	1	0	0	11
Brassica rapa FPsc v1.3	5	4	3	1	0	0	13
Capsella grandiflora v1.1	3	4	2	1	0	0	10
Capsella rubella v1.0	3	2	1	1	0	0	7
Eutrema salsugineum v1.0	3	3	3	1	0	0	10
Citrus							
Citrus sinensis v1.1	2	2	3	2	0	0	9
Citrus clementina v1.0	2	2	3	2	0	0	9
Fabidae							
Linum usitatissimum v1.0	5	4	4	2	0	0	15
Manihot esculenta v4.1	2	1	2	2	0	0	7
Ricinus communis v0.1	3	2	3	1	0	0	9
Nitrogen-fixing							
Cucumis sativus v1.0	2	2	3	2	0	0	9
Fragaria vesca v1.1	2	2	3	2	0	0	9
Glycine max Wm82.a2.v1	4	2	5	3	0	0	14
Malus domestica v1.0	8	5	6	4	0	0	23
Medicago truncatula Mt4.0v1	2	1	4	2	0	0	9
Phaseolus vulgaris v1.0	2	2	4	2	0	0	10
Prunus persica v1.0	2	2	2	2	0	0	8

Sequences have been retrieved from Phytozome 10 and Joint Genome Institute databases. They are provided as Supplementary Material.

genes in a row. In the phylogenetic tree, the genes coding for the chloroplastic and cytosolic isoforms clearly separate into two groups. Since the single *GSTL* gene found in *P. patens* encodes a chloroplastic protein, the ancestral version in the green lineage should be the chloroplastic-encoding gene. On the other hand, the absence of *GSTL* genes in cyanobacteria and algae raises the question of the appearance of these isoforms. In a few cyanobacteria and algae, there are orphan, non-annotated sequences sharing similar active site motifs (CPYA). For this reason, it is tempting to speculate that these sequences might correspond to the ancestral gene and that it has been lost in most organisms. The fact that the overall similarity of these orphan sequences with GSTLs is low and that they do not necessarily form a single clade with GSTLs could come from their rapid and independent evolution. This will have to be further explored when additional genomes and sequences will be available.

The GHR class is widespread, with at least one gene present in almost all analyzed photosynthetic organisms and in most species. There are between 2 and 4 GHR genes (**Table 1**). The absence of gene in some species might be due to either annotation problems or gene loss. Furthermore, the gene family expansion found in some species, e.g. *Zea mays*, *S. moellendorffii*, and *M. domestica* cannot be explained by tandem duplication in this case. For *M. domestica*, which has by far the highest number of Cys-GST genes (23 genes) and exhibits gene expansion in all classes, this can be explained by a recent genome-wide duplication (Velasco et al., 2010). The widespread nature of GHRs is also true outside photosynthetic organisms since they are present almost everywhere including archaea of the halobacteriaceae order, but excluding mammals (**Table 2**). Overall, this suggests that GHRs have crucial functions, or at least functions that cannot be ensured by other GSTs.

Regarding the mPGES-2 class, its genes are absent in cyanobacteria whereas at least one gene is present in algae and terrestrial plants. This suggests that mPGES-2 proteins may have a widespread and essential function. Since most organisms retained only one gene, the duplication observed in some specific organisms probably derives from isolated events. Additionally, these GSTs are also largely distributed among kingdoms since they are found in mammals, nematodes, insects, and trypanosomatids but not fungi (**Table 2**).

The last two classes, GSTI and GSTH, are restricted to specific organisms. The GSTIs are found as a single gene in some cyanobacteria, algae, and in non-vascular plants (*S. moellendorffii*, and *P. patens*). In the phylogenetic tree, they form a single clade that is close to DHAR, possibly indicating that DHARs derive from GSTIs. The fact that GSTIs have been lost at some steps in the green lineage evolution and are no longer present in most terrestrial plants may also indicate that the associated function(s) disappeared or that other GSTs fulfill similar roles. The distribution of GSTHs is even more puzzling as from current available genomes, they are only found in *S. moellendorffii* and *P. patens*. The presence of 8 genes in *P. patens* is particularly striking, taking into account that, from the analysis of EST sequences, there is evidence for the expression of six genes. In *P. patens*, all these genes form a single gene cluster that likely originates from several duplication events.

Table 2 | Characteristics and distribution of Cys-GSTs.

Class	Origin	Typical catalytic motif	Average amino acid length	Oligomerization state
GSTB	Bacteria	$GA_{12}CS$	210	Dimer
GSTO	Mammals, insects, fungi	$_{35}CPFA$	250	Dimer
CLIC	Animals	$_{35}CPFS$	250	Monomer Dimer Oligomer
GSTL	Terrestrial plants	$_{40}CPF/YA$	230	Monomer
DHAR	Algae, terrestrial plants	$_{20}CPFC/S$	220	Monomer
GHR	Some metazoan but animals, algae, terrestrial plants, fungi, cyanobacteria, bacteria, archaea	$_{50}CPWA$	330	Dimer
mPGES-2	Animals, protists, algae, terrestrial plants	$_{110}CPFC$	310	Dimer
GSTH	Bryophyta, lycophyta	$_{50}CPF/YT$	510	?
GSTI	Algae, bryophyta, lycophyta	$_{120}CPYC$	490	?

The case of CLIC proteins is particular since it exists under both a monomeric soluble and an oligomeric transmembrane form. Moreover, the formation of an intramolecular disulfide bond promotes a structural transition that exposes a large hydrophobic surface changing the monomer into a non-covalent dimer (Littler et al., 2004).

SEQUENCE CHARACTERISTICS AND DOMAIN ORGANIZATION OF CYSTEINYL GSTs

From the phylogenetic tree and the amino acid sequence alignments, there are key sequence differences that allow differentiation of each class. In addition to describing conserved motifs typical of each class, we have paid attention to the presence of N- and C-terminal extensions or of sequence insertions. Some differences are also reflected at the structural level since DHARs and GSTLs are monomeric enzymes, whereas GHRs and mPGES-2s are dimeric enzymes (**Table 2**). Thus, the residues forming the dimeric interface should also constitute a good criterion for distinguishing monomeric from dimeric proteins. This will be discussed further when relevant, either in this section or in the section dealing with the structural characteristics. It is worth noting that N-terminal extensions corresponding to predicted targeting sequences have been excluded when describing the size of the proteins and the percentage identity among isoforms.

From previous phylogenetic analyses conducted with Trx superfamily members, important features to consider have been defined. First, the nature and the position of the active site motif is an essential element. It should be recurrently situated at the beginning of the first α-helix of the thioredoxin fold, which does not mean that extra α-helices cannot be found before. For this reason, the position of the catalytic cysteine can vary although it is generally found around position 20 to 50 (**Table 2**). The

second major characteristic used for comparison is the nature of the residue found before a very conserved *cis*-proline that is typical of proteins of the Trx superfamily. This *cis*-proline is generally positioned 30 to 40 amino acids after the active site signature. According to this feature, an alignment of three representative sequences from each class allowed determining the residues that are conserved among Cys-GSTs (**Figure 3A**). The numbering used is the one corresponding to poplar GSTL1. There are six residues that are mostly conserved in all Cys-GST classes, or at least in the sequences used for the alignment. As expected, the catalytic Cys, found at position 36, and the *cis*-Pro discussed above at position 80, are conserved. Interestingly the Pro37 adjacent to the catalytic Cys is also found in the vast majority of sequences. Hence, the differences between GST classes will be essentially visible by checking the two other positions of the CPxx active site motif. Besides, three other residues are also commonly found in all GSTs. As expected for enzymes that share the same co-substrate, some of the residues contributing to the recognition of GSH, Ser92 and Asp172, are conserved. The last conserved residue is a Gly at position 166 for which function is unknown.

With these features in mind, the difference between classes has been simply analyzed by looking at some specific criteria: (i) the percentage identity, (ii) the size of the proteins, (iii) the presence of extra domains, and (iv) the presence of three specific signatures, i.e. the active site sequence motif and the residues immediately before the *cis*-Pro and before the serine involved in GSH binding. Concerning the first criterion, the percentage identity between members of a given class is usually above 50%, whereas it is usually below 20% between classes.

Protein sizes vary slightly within classes, but they vary more significantly between classes. DHARs and GSTLs are the shorter Cys-GSTs, since they have about the same size ranging from 210 to 220 amino acids for the former and from 230 and 240 amino acids for the latter (**Table 2**). Nevertheless, compared to all other Cys-GSTs, DHARs have a nine amino acid insertion before the α1 helix and thus the active site motif (**Figure 3**). GHRs and mPGES-2s also have approximately the same size, *ca* 330 residues, but the sequence insertions explaining the difference with DHARs or GSTLs are not found at the same position. In the case of mPGES-2, the difference comes from the presence of an N-terminal membrane-anchoring region and of an insertion of about 40 residues between the α4 and α5 helices (**Figure 3B**). This insertion is different from the 20 amino acid insertion found between α3 and α4 helices in vertebrate isoforms which corresponds to two α-helices and two β-sheets (this is further discussed in Section 3D Structures). For GHRs, the size difference is essentially linked to insertions in the Trx domain (*ca* 35 amino acids between the active site motif and the *cis*-Pro, i.e. between the β2 strand and α2 helix) and to a final extension of 20 to 25 amino acids. The latter contains most of the residues responsible for the atypical GHR dimerization (see Section 3D Structures). Finally, GSTIs and GSTHs contain about 500 residues. GSTIs are slightly extended in the N-terminal part, but it is not yet clear whether this is a targeting sequence. Most of the additional sequence (around 120–140 residues) is present at the C-terminus and could correspond to a phycoerythrin α-subunit domain found in phycobilisome proteins (**Figure 3B**). GSTHs are also extended at the C-terminal end but this is due to the presence of an hemerythrin domain of *ca* 150–200 residues as its name suggests, followed by about 100 additional amino acids with no domain annotation (**Figure 3B**).

In the next part, we focused on the conservation of the sequence signatures mentioned above. If we consider the CPYC or CPFC active sites found in glutaredoxins as a reference, all plant Cys-GSTs display a reminiscent catalytic motif that differs by only one residue, with the exception of most GHRs which have two variations in their CPWA motif (**Table 2**). In these proteins, the catalytic cysteine is usually found at position 50. It is interesting to note that most algae have two GHR members including one isoform with an atypical CPWC motif (**Figure 2**). Except two algal sequences having a CPYC active site, mPGES-2s have usually a very conserved CPFC motif found around the position 110 owing to the presence of the N-terminal membrane-anchoring region. For DHARs, except a few sequences where the catalytic cysteine seems to be replaced by a glycine, the active site motif, found around the position 20, is usually quite conserved being of the CPFC or CPFS form. Among GSTLs, the active site motif is found around position 40 and it is mostly of the CP[F/Y]A form. The similarity with GSTOs (active site sequence and size of the proteins) might suggest a common origin. This is further supported by the fact that organisms having GSTOs do not have GSTLs and *vice versa*. Another extremely interesting observation is that GSTLs with SPFA motifs can be found in a few analyzed species as *E. grandis*, *Linum usitatissinum*, *M. domestica*, and *Ricinus communis*. This is also true for some fungal GSTOs found in particular in *Phanerochaete chrysosporium* or *carnosa* and *Trametes versicolor* where the classical CPY/FA motif is replaced by a SPY[C/S] motif (Morel et al., 2009). Although it should confer opposite properties (glutathionylating vs. deglutathionylating activities) to the proteins, this suggests that GST genes can be maintained in genomes as long as the replaced amino acid conserves catalytic functions. Concerning GSTIs and GSTHs, the fact that these sequences are restricted to a few species and that the number of sequences available is low makes the analysis of amino acid conservation less robust. Nevertheless, it appears that most GSTI sequences exhibit a conserved WCPYC motif, except one representative from *C. reinhardtii* that has a RCPYC sequence. If it turns out that the N-terminal extension is indeed a targeting sequence, this motif is located around the position 60, otherwise it is located around the position 120. In GSTHs, the active sequence is CP[F/Y]T and depending on the isoform considered, it is usually found around position 50 or 70.

Finally, the residues associated to the *cis*-Pro80 and to Ser92 may help to definitely discriminate GST classes. The classes that cannot be differentiated using these signatures are GSTLs and GHRs which usually exhibit VP and ES motives, and DHARs and mPGES-2 which have VP and DS motives. However, as explained above, the other factors will allow distinguishing them. The last two classes, GSTIs and GSTHs, have specific recognizable sequences, LP and ES or [F/Y]P and GS, respectively.

GENE EXPRESSION

To date, there is not much data available on plant Cys-GSTs, both at genetic and physiological levels. Nonetheless, the physiological

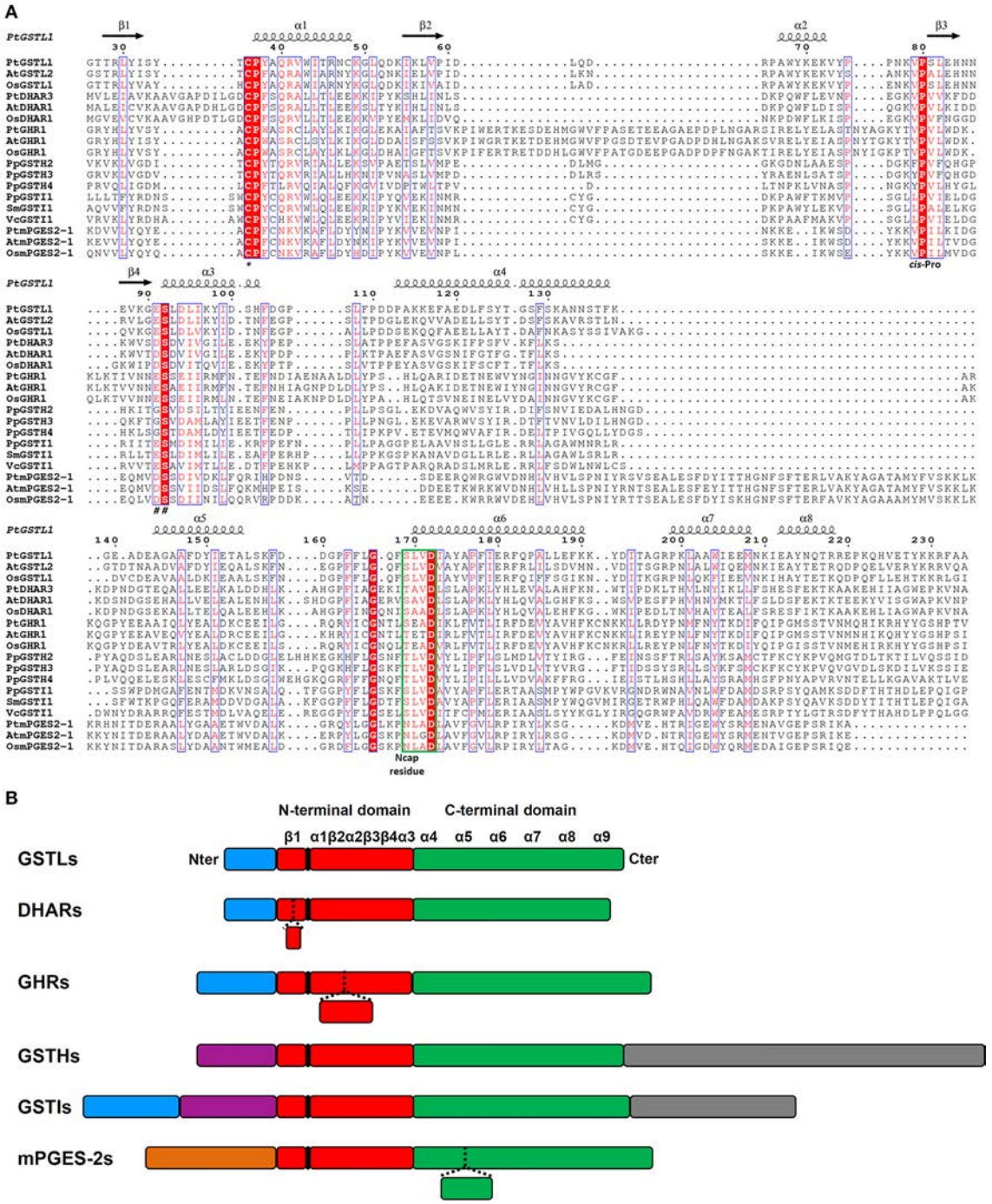


FIGURE 3 | Amino acid alignment and protein architecture of plant Cys-GSTs. (A) Amino acid sequence alignment of three representative members from each Cys-GST class. The sequences were structurally aligned using PROMALS3D server using as references the solved structures of PtGSTL1 [PDB code 4PQH (Lallement et al., 2014)], PtGSTL3 [PDB code 4PQI (Lallement et al., 2014)], *Phanerochaete chrysosporium* GHR1 [PDB code 3PPU (Meux et al., 2011)], and *Macaca fascicularis* mPGES-2 [PDB code 1Z9H (Yamada et al., 2005)] since there is no structure available for DHARs, GSTIs, and GSTHs. Since the structure of poplar GSTL1 has been solved, its secondary structures have been indicated as reference using ESPript 3.0 (http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php), with the helices and the arrows corresponding respectively to α-helices and to β-strands. Strictly conserved residues are marked in white characters on a red background, whereas residues with similar functional groups are in red characters on white background. The indicated numbering corresponds to that of PtGSTL1 which has been used as a whole. For clarity, N- and C-terminal extensions present in Cys-GSTs have been removed from the alignment to keep only the sequences corresponding to secondary structures forming the GST fold. At is for *Arabidopsis thaliana*, Pt for *Populus trichocarpa*, Os for *Oryza sativa*, Pp for *Physcomitrella patens*, Sm for *Selaginella moellendorffii*, and Vc for *Volvox carteri*. The catalytic cysteine (*), *cis*-proline (*cis*-Pro), residues stabilizing the γ-glutamate residue of glutathione (##) and N-cap residue are shown. The N-capping box is surrounded in green. **(B)** Schematic representation of the

(Continued)

FIGURE 3 | Continued
protein architecture of plant Cys-GSTs. The N-terminal Trx-like domain and the all-helical C-terminal domain are represented respectively in red and green. Blue boxes correspond to putative or confirmed targeting sequences. The orange box corresponds to the membrane anchoring tail of mPGES-2. Purple boxes represent N-terminal extensions that do not correspond to targeting sequences and gray boxes represent additional C-terminal domains. The position of the active site motif harboring the catalytic cysteine is indicated in black. The presence of inserted sequences in some classes corresponds to dashed lines in other classes. Secondary structures are shown as α-helices and β-strands. The size of the boxes is proportional to the length in amino acids.

roles of these enzymes can certainly be better understood by delineating the gene expression in plant organs or in response to environmental constraints. Since only partial information is available for each class, analyzing microarray experiments represents a valuable approach ahead of targeted expression studies. Hereto, *A. thaliana* microarray experiments were analyzed to assess both the developmental expression patterns of each GST using the EFP browser (Winter et al., 2007) and the transcriptional regulation occurring in response to environmental stimuli using Genevestigator (3072 perturbations were analyzed) (Hruz et al., 2008). Among the 14 genes coding for Cys-GSTs in Arabidopsis, four groups can be distinguished based on the absolute levels of expression, ranging from high to low: (i) DHAR1, DHAR3 and GSTL3, (ii) GSTL2, DHAR2 and GHR1, (iii) mPGES-2, GHR2 and GHR4, and (iv) GSTL1 and GHR3.

The expression of mPGES-2 genes has never been studied in plants. In mammals, however, the genes and corresponding enzymes have been shown to be constitutively expressed and involved in prostaglandin E metabolism, respectively (Murakami et al., 2003). In Arabidopsis, *mPGES-2* transcripts are found in all analyzed organs and at quite constant level (**Figure 4**). Based on the data available in Genevestigator, *A. thaliana mPGES-2* is the most significantly regulated gene in response to environmental stresses among Cys-GSTs. It is overexpressed in response to cold, drought, hypoxia, increases in light, chemical and biotic stresses, and shows its strongest up-regulation under heat stress. Altogether, this suggests that this gene may be involved in general tolerance mechanisms to biotic and abiotic stresses.

Regarding *GSTL* genes, *AtGSTL2* and *AtGSTL3* show similar expression patterns, particularly in green tissues, such as leaves, flower sepals, siliques, and developing seeds, whereas *AtGSTL1* transcripts are almost exclusively found in roots, senescing leaves, and pollen (**Figure 4**). In terms of stress responses, *AtGSTL1* is strongly up-regulated in several conditions including biotic interactions, treatment with chemicals, salt and iron-starvation stresses and, to a lesser extent, in response to hypoxia. This is consistent with a study showing that the *AtGSTL1* gene is induced in root cell cultures in response to buthionine sulfoximine (BSO), tert-butyl hydroperoxide, dichlormid, and 2,4 dichlorophenoxy acetic acid (Dixon et al., 2002). This also corroborates the observation that expression of tomato *GSTL3* is induced by salt treatments in both roots and leaves (Csiszar et al., 2014). Interestingly, in contrast to *AtGSTL1*, *AtGSTL2*, and *AtGSTL3* are less responsive to environmental stress factors, but respond specifically to conditions involving increases in light, such as germination and light-shifts. These differences in expression patterns may help identifying the function of the three *AtGSTL* genes. Additionally, a number of studies has explored the expression and tissue distribution of *GSTLs* in other plant species. For instance, the three rice *GSTL* genes are all differentially expressed in response to arsenic treatments (Kumar et al., 2013a). Moreover, *OsGSTL1* and *OsGSTL2* are both constitutively expressed and involved in xenobiotic and oxidative stress tolerance in rice, whereas *OsGSTL2* is also specifically up-regulated in roots after herbicide (chlorsulfuron and glyphosate) and hormone treatments (salicylic acid and naphthalene acetic acid) (Hu et al., 2009, 2011a,b). Consistently, Arabidopsis transgenic lines expressing *OsGSTL2* are more tolerant to abiotic stresses such as heavy metals, cold, drought, and salt stress (Kumar et al., 2013a,b). Recently, the expression of the three poplar GSTL genes was studied in a naturally growing *Populus trichocarpa* adult tree (Lallement et al., 2014). One of these genes, *PtGSTL3*, generates two transcripts by alternative splicing, *PtGSTL3A* and *PtGSTL3B*, the latter being very weakly expressed. While *PtGSTL2* and *PtGSTL3A* seem to be constitutively expressed, all PtGSTL genes are preferentially expressed in the reproductive organs (flowers, fruits, buds) (Lallement et al., 2014). Nevertheless, poplar *GSTLs* have also been detected in leaves and roots (Lan et al., 2009). Altogether these results suggest that *GSTLs* are mainly expressed in organs that have a more intense secondary metabolism, which is consistent with the proposal that GSTLs are involved in the biosynthesis and/or maintenance of the flavonoid pool (see the Section Enzymatic Properties and Physiological Roles).

The three *A. thaliana DHAR* genes are expressed in most organs tested. Although *AtDHAR1* and *AtDHAR3* are either weakly or not expressed in pollen, this may be compensated by *AtDHAR2* which has its highest expression in this organ (**Figure 4**). Aside from this, the only notable difference is that *AtDHAR3* is relatively strongly expressed in leaves, which is consistent with its predicted localization to plastids (**Figure 4**). In other organisms where *DHAR* expression was studied, the genes were shown to be expressed in most tissues/organs. This is the case for the three poplar *DHARs* in roots, shoots, leaves, phloem, and buds (Lan et al., 2009; Tang and Yang, 2013) and for one *DHAR* from *Pinus bungeana* in buds, needles, phloem from stems, roots, and seedlings (Yang et al., 2009). However, in the moss *P. patens*, one of the three genes does not seem to be expressed at all (Liu et al., 2013). In response to environmental variations, the microarray data of *A. thaliana* indicates that *AtDHAR2* is the most responsive gene being up-regulated during germination and in response to biotic stress, chemicals, hypoxia, and drought. In contrast, *AtDHAR1* and *AtDHAR3* are up-regulated in only two conditions, excess light or drought and excess light or germination, respectively. Surprisingly, both genes are down-regulated in response to chemicals, a condition where GSTs are usually over-expressed. In plants, several independent studies have been performed with the aim of addressing the role of *DHARs* during stress response. For instance, *AtDHAR1* is

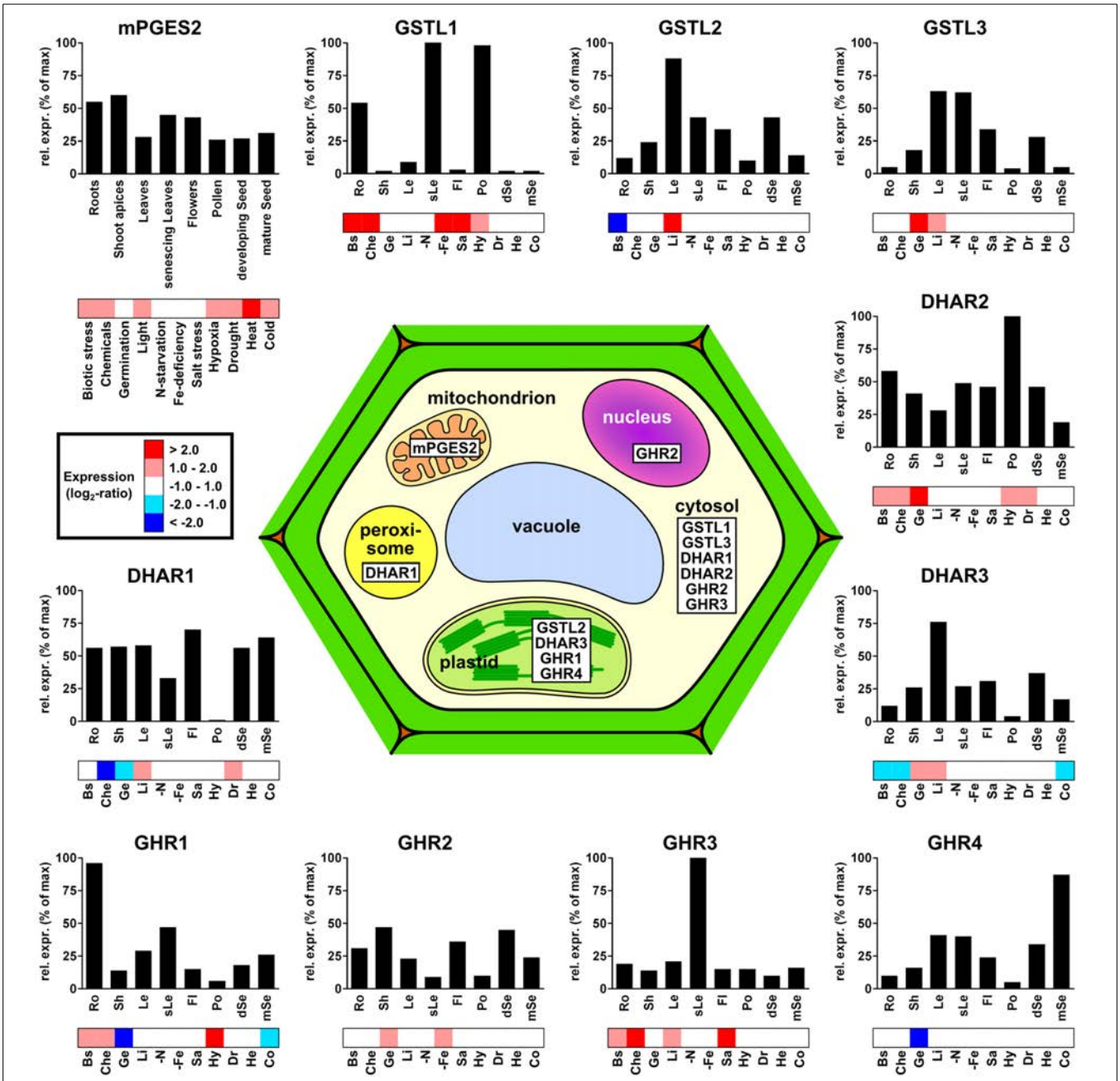


FIGURE 4 | Subcellular localization and gene expression profiles of the different *Arabidopsis thaliana* Cys-GSTs. For each GST, the relative transcript expression is shown in relation to both plant developmental stages (bar-graphs) and perturbations (heatmaps). For clarity, the number of developmental conditions was reduced to eight classes, where each gene was normalized to its maximum expression within the selected dataset (see Materials and Methods). For the response to perturbations, the expression values were organized into five color-coded groups based on their log_2-ratios. For clarity, the numerous perturbations included in the dataset were grouped into 11 classes: Biotic stress (Bs), Chemicals (Che), Germination (Ge), Light (Li), N-starvation (-N), Fe-deficiency (-Fe), Salt stress (Sa), Hypoxia (Hy), Drought (Dr), Heat (He), and Cold (Co).

up-regulated in response to norflurazon, menadione, paraquat, and antimycin A, treatments known to produce reactive oxygen species (Chew et al., 2003). On the other hand, *AtDHAR2* expression is induced in root cell cultures in response to BSO and chloro-dinitrobenzene (CDNB) (Dixon et al., 2002). However, in other organisms, *DHARs* are not always regulated in the same manner in response to stress conditions. For example, *DHAR2* from *P. patens* is strongly down-regulated by the addition of H_2O_2, salt, salicylic acid, and atrazine (Liu et al., 2013), whereas poplar *DHAR2*, in contrast to poplar *DHAR3*, is up-regulated in shoots but not in roots in response to H_2O_2, atrazine and to a lesser extent CDNB (Lan et al., 2009). Altogether these data

point to a crucial function of DHARs and consequently ascorbic acid for stress responses, although the pattern of expression and regulation of DHAR genes differ from one organism to another.

Since GHRs were only recently identified in plants, they have not been studied in detail and very little is known about their expression and regulation. In yeast, GHR genes were formerly referred to as GSTO1, GSTO2, and GSTO3. The *GSTO1* gene, which encodes a peroxisomal protein involved in sulfur metabolism, was shown to be induced by oxidative stress conditions (Barreto et al., 2006). Based on the analysis of *A. thaliana* microarrays, it is clear that GHRs are among the Cys-GSTs that are the least expressed, even though they are expressed in all plant organs analyzed. Apart from *GHR2*, which shows no preferential expression, the genes are each predominantly expressed in a particular organ, roots for *GHR1*, senescent leaves for *GHR3* and mature seeds for *GHR4* (**Figure 4**). In response to stress conditions, *A. thaliana* GHR genes are differentially regulated as well. *AtGHR4* appears only to be down-regulated during germination. While *AtGHR1* is down-regulated during germination and in response to cold, it is up-regulated in response to chemicals and biotic stress, together with *GHR3*. However, the expression of *AtGHR1* is also increased by hypoxia, while *AtGHR3* is increased in response to salt treatments and increases in light. Finally, in contrast to *AtGHR1* and *AtGHR4*, *AtGHR2* is up-regulated during germination and also shows up-regulation in response to iron starvation.

SUBCELLULAR LOCALIZATION

Deciphering the subcellular localization of all these proteins should also contribute to the understanding of their biological role. The data present in the literature for *A. thaliana* and poplar Cys-GSTs, originating from proteomic studies or from GFP fusion experiments have been compiled together with bioinformatic predictions for the presence of targeting sequences and summarized in **Figure 4** and **Table 3**. First, while not much is known about plant mPGES-2s, mammalian mPGES-2s exhibit a dual subcellular localization associated to both the Golgi membrane through their N-terminal part and the cytoplasm after proteolytic cleavage of the N-terminal hydrophobic domain (Tanikawa et al., 2002; Murakami et al., 2003). Similarly, plant mPGES-2 proteins possess an N-terminal extension, but it is predicted to correspond to a mitochondrial or plastid targeting sequence. This might be supported by the identification of this protein in two proteomic studies of mitochondrial protein fractions (**Table 3**) (Heazlewood et al., 2004; Klodmann et al., 2011). However, a careful inspection of the nature of the amino acids present in this region is rather consistent with a membrane-anchoring tail. Accordingly, the Arabidopsis ortholog was also identified in a proteomic study of plasma membrane proteins and an N-terminal transmembrane domain is indeed predicted by some prediction programs devoted to their identification (**Table 3**) (Mitra et al., 2009). Altogether, these data will have to be firmly established by complementary experiments, especially if a cleavage could also generate soluble isoforms. The mPGES-2s could be the only membrane associated Cys-GSTs since no other protein was predicted to possess a membrane-anchoring region.

Among DHARs, based on its occurrence in chloroplast proteome analyses and the presence of an N-terminal extension in the protein sequence, *A. thaliana* DHAR3 should be chloroplastic (**Table 3**). Poplar and *P. patens* orthologs have a similar localization (Liu et al., 2013; Tang and Yang, 2013). The two other proteins from Arabidopsis are predicted to be cytosolic as they do not exhibit visible targeting sequences. However, proteome analyses and YFP fusion proteins indicate that AtDHAR1 is also present in peroxisomes (Reumann et al., 2009; Grefen et al., 2010).

Concerning GSTLs, based on proteome analyses and on the presence of an N-terminal predicted targeting sequence, AtGSTL2 is clearly a plastidial protein and it may also be present in peroxisomes as shown by GFP fusion experiments as well as in the cytosol (Dixon et al., 2009). The poplar ortholog, PtGSTL1, is also present in plastids but *a priori* not in peroxisomes (Lallement et al., 2014) and the *P. patens* isoform is also plastidial (Liu et al., 2013). The two other GSTLs found in *A. thaliana* and *P. trichocarpa* should be cytosolic proteins, although a nuclear localization was observed when poplar proteins were fused to GFP (Lallement et al., 2014). Considering the absence of a clear NLS (nuclear localization signal), this nuclear localization is more likely due to a passive diffusion through nuclear pore rather than to a specific targeting.

Concerning GHRs, there is no information available yet. Among the four isoforms found in *A. thaliana*, two of them are predicted to be chloroplastic proteins and have additionally been indeed identified from high-throughput proteomic analyses (**Table 3**). Concerning Hemerythrin GSTs, the proteins do not exhibit clear targeting sequences suggesting cytosolic localization. Accordingly, four GSTHs from *P. patens*, PpGSTH1, 2, 3, and 7, presented a nucleo-cytoplasmic localization in GFP fusion experiments (Liu et al., 2013). Concerning GSTIs, according to the existence of clearly visible N-terminal extensions in some representative members, several prediction programs indicate that they could be targeted either to the chloroplasts or to mitochondria, although this remains to be demonstrated experimentally.

3D STRUCTURES

At the structural level, GSTs consist of an N-terminal domain adopting a thioredoxin fold and an all-helical C-terminal domain (Atkinson and Babbitt, 2009). The GSH binding site, or G site, is located in a cleft formed between the two domains and most of the residues contacting GSH are provided by the N-terminal domain. The binding site for the hydrophobic electrophiles, or H site, is located immediately adjacent to the G site and forms part of the solvent-exposed cleft between both domains. For the H site, most of the residues contacting the electrophiles are provided by the C-terminal domain. Both sites form the protein active site. Moreover, non-catalytic ligandin sites (L site) were defined in GSTs. Two types of L site may be roughly distinguished: those overlapping partially with the H site and those located at the dimer interface straddling the two fold axis (Litwack et al., 1971; McTigue et al., 1995; Rossjohn et al., 1998; Smith et al., 2003; Axarli et al., 2004; Dixon et al., 2008; Brock et al., 2013).

The N-terminal thioredoxin domain is often described as two distinct motifs: an N-terminal motif (β1α1β2) and a C-terminal

Table 3 | Subcellular localization of *Arabidopsis thaliana* Cys-GST members and of poplar orthologs.

Gene name	Accession number	Predicted subcellular localization	Confirmed localization and other proteomic evidence	Amino acid length	Orthologs in poplar	References
DHAR1	At1g19570	Elsewhere	- *FP fusions:* cytosol[a], peroxisome[b] - *High-throughput proteomic:* mitochondria[c], cytosol[d], plasma membrane[e], chloroplast[f]	213	- *FP fusions:* DHAR2: cytosol[b], DHAR3: cytosol[b]	[a]Grefen et al., 2010 [b]Reumann et al., 2009 [c]Chew et al., 2003 [d]Ito et al., 2011 [e]Marmagne et al., 2007 [f]Peltier et al., 2006
DHAR2	At1g75270	Elsewhere	- *High-throughput proteomic*: cytosol[a], plasma membrane[b]	213	- *FP fusions:* DHAR2: cytosol[b], DHAR3: cytosol[b]	[a]Ito et al., 2011 [b]Marmagne et al., 2007 [c]Tang and Yang, 2013
DHAR3	At5g16710	Chloroplast	- *High-throughput proteomic*: chloroplast[a]	258	- *FP fusions:* DHAR1: chloroplast[b]	[a]Zybailov et al., 2008 [b]Tang and Yang, 2013
GSTL1	At5g02780	Elsewhere	None	237	- *FP fusions:* GSTL2, GSTL3A & B: nucleocytoplasmic[a]	[a]Lallement et al., 2014
GSTL2	At3g55040	Chloroplast	- *FP fusions*: peroxisome[a], - *High-throughput proteomic*: chloroplast[b–d]	292	- *FP fusions:* GSTL1: chloroplast[e]	[a]Dixon et al., 2009 [b]Zybailov et al., 2008 [c]Peltier et al., 2006 [d]Ferro et al., 2010 [e]Lallement et al., 2014
GSTL3	At5g02790	Elsewhere	- *High-throughput proteomic*: cytosol[a]	235	- *FP fusions:* GSTL2, GSTL3A & B: nucleocytoplasmic[b]	[a]Ito et al., 2011 [b]Lallement et al., 2014
GHR1	At4g19880	Chloroplast	- *High-throughput proteomic*: cytosol[a], chloroplast[b]	356		[a]Ito et al., 2011 [b]Klodmann et al., 2011
GHR2	At5g45020	Elsewhere	None	325		
GHR3	At5g44990	Elsewhere	None	350		
GHR4	At5g44000	Chloroplast	- *High-throughput proteomic*: chloroplast[a]	399		[a]Ferro et al., 2010
mPGES-2	At5g42150	Mitochondria or chloroplast	- *High-throughput proteomic*: mitochondria[a,b], plasma membrane[c]	315		[a]Heazlewood et al., 2004 [b]Klodmann et al., 2011 [c]Mitra et al., 2009

The prediction of subcellular localization was performed by compiling results obtained from various softwares as Predotar, TargetP, and Wolfpsort. Experimental confirmation consisting of high-throughput proteome analyses and fusions with fluorescent proteins (FP fusions) and associated references are indicated when available.

motif (β3β4α3) linked by helix α2 and which together form a four β-sheet in the order 2134 with β3 anti-parallel to the others (**Figure 5A**). Despite the low primary sequence conservation between GST classes, the position of the key residues is maintained. As mentioned above, the cysteine or serine of the catalytic signature is located at the beginning of α1 helix which also contains charged residues involved in the proton transfer reaction. For GSTs having a catalytic tyrosine residue, it is positioned at the end of the β1 strand. The invariant *cis*-Pro residue is located in the loop region before β3 and is thought to be implicated in the maintenance of the enzyme fold rather than playing a role in the enzymatic reaction (**Figure 3A**) (Allocati et al., 1999). The residues responsible for the non-covalent anchoring of GSH are well-conserved in most known GSTs. Glutamate/aspartate/glutamine residues and the adjacent serine residue in the loop β4-α3, stabilize the charged group of GluGS (γ-glutamate residue of glutathione). The main chain of a valine/leucine/isoleucine/threonine residue that precedes the conserved *cis*-proline is hydrogen-bonded to the backbone of CysGS (cysteine residue of glutathione) (**Figure 3A**). In the loop β2-α2, a charged residue (lysine, arginine), not present in all GSTs, makes a salt bridge with the carboxyl group of GlyGS (glycine residue of glutathione). In addition to these usual interactions with GSH, other less conserved residues can also contribute to the stabilization of GSH in specific cases.

The C-terminal domain exhibits a bundle of helices whose number varies between each class. This less conserved domain, compared to the N-terminal domain, notably contains a well-conserved N-capping box (S/TXXD) including the S/T N-cap residue (**Figure 3A**) and a hydrophobic staple motif located at the

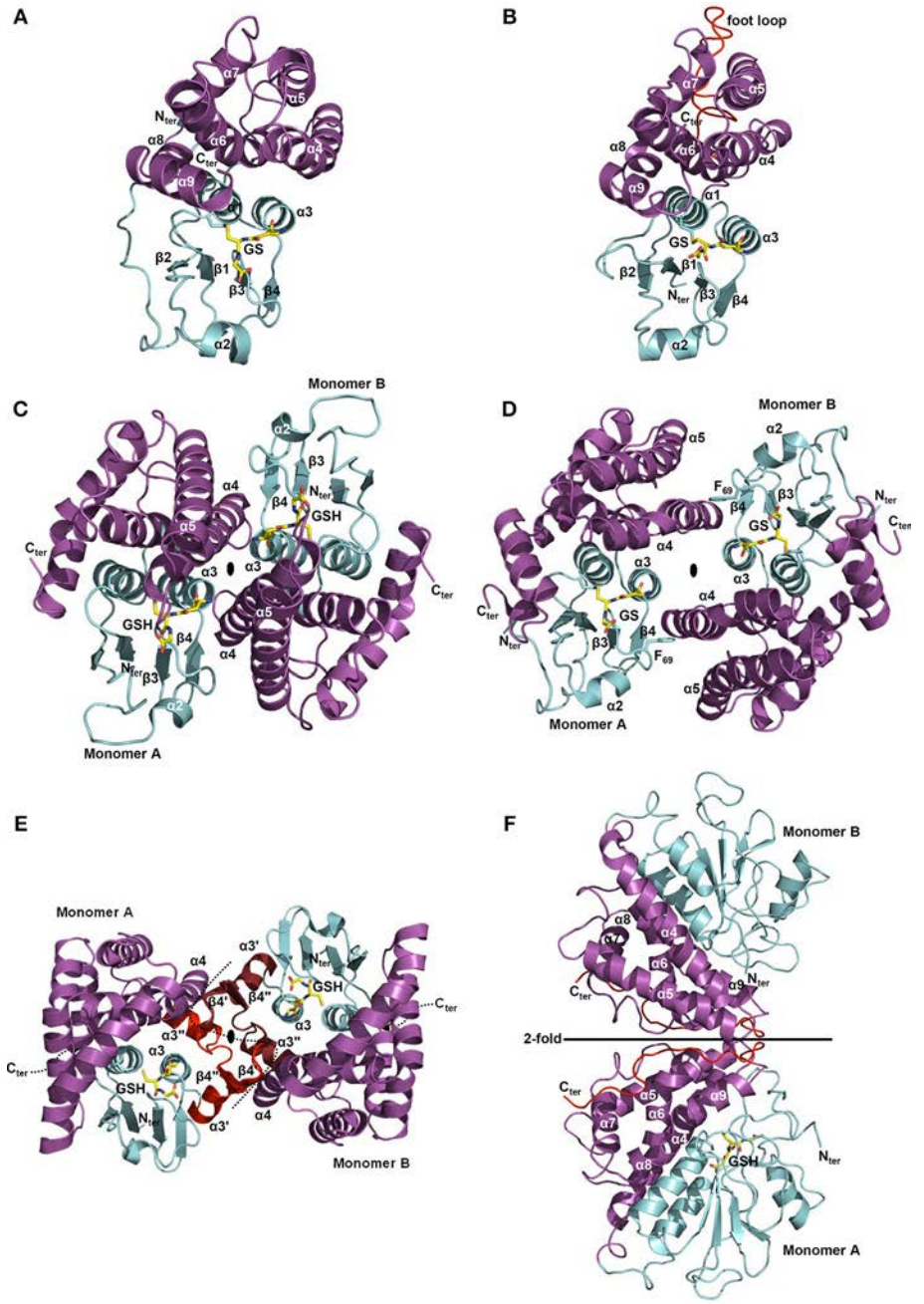


FIGURE 5 | Structural organization of Cys-GSTs. All structures are shown as cartoon with the N- and C-terminal domains colored in cyan and in purple, respectively. Glutathione (GSH) or glutathione adducts (GS) are represented as sticks. In **F**, glutathione is only present in monomer A. All figures have been prepared with Pymol software. **(A,B)** Monomeric organization of **(A)** GSTL3 from *Populus trichocarpa* (PDB code 4PQI) and **(B)** CLIC1 from *Homo sapiens* (PDB code 1K0M). These monomeric enzymes illustrate the classical GST fold which consists of an N-terminal domain adopting a thioredoxin fold (β1α1β2α2β3β4α3) and an all helical C-terminal domain. Human CLIC1 **(B)** harbors a long negatively charged loop also referred as "foot loop" (colored in red) inserted between helices 5 and 6. This loop is characteristic of CLICs and might be responsible for interaction with other proteins. The glutathione adduct (GS) has been modeled based on the superimposition with a glutathionylated version of *Homo sapiens* CLIC1 (PDB code 1K0N). **(C,D)** Classical dimerization mode of GSTs as shown using **(C)** *Ochrobactrum anthropi* GSTB (PDB code 2NTO) and **(D)** *Homo sapiens* GSTO1-1 (PDB code 1EEM). The monomers associate along a structural C2 axis. The N-terminal domain (loop α2-β3, strand β4 and helix α3) of one subunit interacts with the C-terminal domain (helices α4 and α5) of the other monomer. The dimer interface is either hydrophilic **(C)** or hydrophobic **(D)**. The hydrophobic interaction is characterized by the insertion of a phenylalanine (or a tyrosine) residue belonging to the α2-β3 loop into a hydrophobic pocket located between helices α4 and α5 of the C-terminal domain of the other subunit ("lock-and-key" motif). **(E)** *Macaca fascicularis* mPGES-2 (PDB code 2PBJ). The dimerization occurs via a α3′β4′β4″α3″ structure (colored in red) inserted between α3 and α4 that interacts with those of the other monomer (colored in ruby). Note that this insertion is not found in plant sequences. **(F)** *Phanerochaete chrysosporium* GHR1 (3PPU). The two monomers interact via their C-terminal domain (in red) and are related to each other by a 2-fold symmetry axis.

N-terminal part of α6 helix. The N-capping box motif has been proposed to participate to the nucleation of helices as well as their folding and stabilization by forming reciprocal main chain-side chain hydrogen bonds between the N-cap (Ser/Thr) and the N3 (Glu/Asp) residues. The hydrophobic staple motif consists of a specific i,i+5 hydrophobic interaction between a residue (N′) that precedes the N-cap residue and a residue (N4) located within the α6-helix. The nomenclature commonly used is as follows: N-N′-Ncap-N1-N2-N3-N4 (XhS/TXXDh, with h: hydrophobic residue and X: non conserved residue) (Richardson and Richardson, 1988). These two local structural motifs have a critical role in protein folding and stability of α-helices. The substitution of the capping residue greatly destabilizes the structure of GSTs, as well as their folding. It has also been proposed that the hydrophobic staple motif represents an evolutionarily conserved determinant for rapid folding of the enzyme. In addition, a glycine residue located four amino acids upstream (three residues in GSTLs) the N-cap residue (S/T) is also well-conserved in GSTs and is likely essential for folding by stabilizing the GXXh(S/T)XXDh conserved loop-helix substructure (Kong et al., 2003) demonstrating the importance of these motifs both for protein folding and stability. Concerning the residues involved in the H site, they are generally hydrophobic and are located in a crevice between the N- and C-terminal domains at the vicinity of the G site. The nature of the amino acids contributing to the substrate recognition in this H-site has not been identified so often since it generally requires the crystal structure of complexes. Moreover, from known examples, they are quite variable among GST classes which likely explain the diversity of substrates accommodated by the different GSTs but may at the same time also explain the lack of specificity among certain classes for some substrates (Wilce and Parker, 1994; Armstrong, 1997). For these reasons, we will not discuss in detail the structure and residues forming the H site in each GST class.

With the exception of a few classes such as GSTLs, DHARs and soluble CLICs that exist as monomeric enzymes (**Figures 5A,B**) (Dixon et al., 2002), other GSTs are mostly dimeric proteins and very often adopt the same dimerization mode. Both subunits are connected along a structural C2 axis roughly parallel to helix bundle axis (binary axial symmetry). The main interactions between the two subunits are held between the N-terminal domain of one subunit and the C-terminal domain of the other. Thus, the loop α2-β3, the strand β4 and the helix α3 of one subunit interacts with the helices α4 and α5 of the other subunit as in GSTBs (**Figure 5C**). This dimer is considered as the classical dimerization mode in GSTs. In Theta, Sigma and Beta members, the interaction surface is rather hydrophilic whereas in Alpha, Phi, Mu, Omega, Pi, Tau, Zeta, and FuA GSTs, the surface is more hydrophobic (Frova, 2006). The hydrophobic interaction is characterized by a hydrophobic "lock-and-key" (or "ball and socket") motif which holds the two protomers together and which is established due to the side chain of a phenylalanine (or a tyrosine) residue (key) belonging to the α2-β3 loop (Dirr et al., 1994). This residue is inserted into a hydrophobic pocket (lock) located between helices α4 and α5 of the C-terminal domain of the other subunit as shown for human GSTO1-1 (**Figure 5D**). This particular interaction is absent in Theta, Sigma, Beta, and Tau members and is replaced by an extensive network of polar interactions (**Figure 5C**) (Armstrong, 1997; Stevens et al., 2000). Beyond the canonical dimer, other dimerization modes have been described for GSTs. For example, FuA GST dimeric arrangement is close to the one observed in the canonical dimer in that their C2 axis is along the same direction (Figure S1A). In FuA GSTs, the two protomers are translated in the interface plane bringing the α-helical domains closer to each other. An additional β-hairpin (β2′-β2″) inserted between α2 and β3 inhibits the formation of the regular GST dimer and acts as a lid over the G site (Mathieu et al., 2012). A GST from the soil bacterium *Ralstonia solanacearum* (PDB code 4KF9) exhibits a similar dimerization mode as GSTFuA. In this case, the β-hairpin (β2′-β2″) is absent but a long C-terminal extension, which extends the β-sheet structure, prevents the formation of the classical dimer (Figure S1B). In *Macaca fascicularis* mPGES-2, the dimerization remains similar to the canonical assembly and occurs through an insertion of two α-helices and two β-strands (α3′β4′β4″α3″) between α3 and α4 that interacts with those of the other monomer (**Figure 5E**) (Yamada et al., 2005; Yamada and Takusagawa, 2007). However, this insertion seems to be specific to vertebrates and is absent in photosynthetic organisms, which suggests a different organization. In GHRs, the mode of dimerization is completely different, the monomers associate exclusively via their C-terminal domain and notably via a coil of about 20 residues that follows the helix α9 (Meux et al., 2011). Helix α9 is a structural characteristic that is also found in GSTOs (Board et al., 2000), Tau GSTs (Thom et al., 2002), Delta GSTs (Oakley et al., 2001) and GSTLs (Lallement et al., 2014). The 20 C-terminal residues of one monomer mainly interact with the N-terminal end of helix α5 and with the C-terminal end of helix α6 of the other monomer, allowing the formation of a dimer that completely differs from the usual GST dimer (**Figure 5F**) (Meux et al., 2011). In addition, a recently characterized GST from *Leishmania infantum* (TDR1 protein) does not exhibit the canonical dimerization mode but consists of a unique trimer of subunits each containing two glutathione S-transferase domains (Figure S1C) (Fyfe et al., 2012). While the diversity of GST quaternary structures might still grow with the release and accumulation of structural data, the majority of GSTs adopts the canonical dimeric quaternary structure.

To date, there are 10 structures of bacterial GSTBs (**Table 4**). A *B. xenovorans* GSTB structure has been obtained in complex with GSH in the G site and the physiological product, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenyl-2,4-dienoate, in the H site (Tocheva et al., 2006). Concerning CLICs, structures from three organisms, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, and *Homo sapiens* are available (Harrop et al., 2001; Littler et al., 2008). Besides, a few structures have been obtained for the other cysteinyl-GSTs but not for DHAR. For mPGES-2s, only the structure of the *M. fascicularis* isoform has been solved (Yamada et al., 2005). Concerning GSTOs, in addition to one structure from *Bombyx mori* GSTO3 (Chen et al., 2011), several structures are known for human GSTO1 and GSTO2, alone or in complex with GSH or some substrates (**Table 4**). Recently, the first 3D structures of GSTLs (poplar GSTL1 and L3) in complex with glutathione have been solved (Lallement et al., 2014). Finally, a few GHR/xi GST structures have been solved from various

Table 4 | Tridimensional structures of Cys-GSTs from all kingdoms.

Class	Name	Organism	Ligand 1	Ligand 2	PDB	References
?	TDR1	*L. infantum*	GSH	1,2-Ethanediol	4AGS	Fyfe et al., 2012
?	LigG	*S. paucimobilis*	GSH	SO_4^{2-}; Acetate	4G10	Meux et al., 2012
GSTB	BphK	*B. xenovorans*	GSH	2-Hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid	2DSA	Tocheva et al., 2006
GSTB		*E. coli*	GTS	–	1A0F	Nishida et al., 1998
GSTB		*M. haemolytica*	GSH	Triethylene glycol; Cl^-; Acetate	4IW9	Unpublished
GSTB		*M. capsulatus*	GSH	Glycerol	3UAR	Unpublished
GSTB		*O. anthropi*	GSH	SO_4^{2-}	2NTO	Federici et al., 2007
GSTB		*P. mirabilis*	GSH	–	1PMT	Rossjohn et al., 1998
GSTB		*S. flexneri*	GSH	–	4KGI	Unpublished
GSTB		*S. paucimobilis*	GSH	–	1F2E	Unpublished
GSTB		*X. fastidiosa*	GSH	Cl^-	2X64	Unpublished
GSTB		*Y. pestis*	GSH	Glycerol	4G9H	Unpublished
CLIC	EXC-4	*C. elegans*	–	Ca^{2+}	2YV9	Littler et al., 2008
CLIC		*D. melanogaster*	–	Ca^{2+}; I^-	2YV7	Littler et al., 2008
CLIC	CLIC1	*H. sapiens*	GSH	–	1K0N	Harrop et al., 2001
CLIC	CLIC4	*H. sapiens*	–	–	2AHE	Littler et al., 2004
CLIC	CLIC2	*H. sapiens*	GSH	–	2R4V	Cromer et al., 2007
CLIC	CLIC3	*H. sapiens*	–	SO_4^{2-}	3FY7	Littler et al., 2010
GRX	Grx2	*E. coli*	–	–	1G7O	Xia et al., 2001
GRX	Grx2	*S. enterica*	GSH	SO_4^{2-}; Cl^-	3IR4	Unpublished
GSTO*	GSTO3-3	*B. mori*	–	Glycerol	3RBT	Chen et al., 2011
GSTO	GSTO1-1	*H. sapiens*	GSH	SO_4^{2-}	1EEM	Board et al., 2000
GSTO	GSTO2-2	*H. sapiens*	GSH	Cl^-	3Q19	Zhou et al., 2012
mPGES-2		*M. fascicularis*	–	Indomethacin; Cl^-; Acetate	1Z9H	Yamada et al., 2005
GHR	YqjG	*E. coli*	–	GS-menadione	4G0K	Green et al., 2012
GHR		*C. glutamicum*	–	1,2-Ethanediol; Glycerol	3M1G	Unpublished
GHR		*P. chrysosporium*	GSH	–	3PPU	Meux et al., 2011
GHR	PcpF	*S. chlorophenolicum*	–	–	4FQU	Green et al., 2012
GHR		*G. bronchialis*	–	–	4PTS	Unpublished
GSTL	GSTL3	*P. trichocarpa*	GSH	Ca^{2+}	4PQI	Lallement et al., 2014
GSTL	GSTL1	*P. trichocarpa*	GSH	Na^+	4PQH	Lallement et al., 2014

Available Cys-GST structures have been retrieved from the RCSB Protein data bank (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do). Only the first solved structures of wild-type isoforms have been listed, but for several proteins as human CLIC or GSTOs or E. coli YqjG, other structures have been obtained either for mutated proteins or for wild-type proteins in complex with GSH or another second ligand. For instance, in the case of E. coli YqjG, there are 3 structures described in the same study, one in apoform, one with GSH and one with GS-menadione. Beyond GSH, structures of Cys-GSTs with physiological substrates have been obtained in rare cases. The compounds indicated in the ligand 2 column essentially come from crystallization solutions.

**GSTO3-3 from B. mori is phylogenetically related to and classified as GSTOs although it displays an asparagine instead of the catalytic cysteine. GTS is for glutathione sulfonate.*

organisms, PcGHR1/Xi GST from *P. chrysosporium*, YqjG from *E. coli*, and its ortholog from *Corynebacterium glutamicum*, *Gordonia bronchialis*, and *Sphingobium chlorophenolicum* namely PcpF, but none from plants (Meux et al., 2011; Green et al., 2012).

ENZYMATIC PROPERTIES AND PHYSIOLOGICAL ROLES

As already mentioned, owing to the presence of a catalytic cysteine residue, Cys-GSTs have particular enzymatic properties since they should in principle catalyze deglutathionylation reactions by performing nucleophilic attacks on various GSH-conjugated substrates (Board et al., 2000; Dixon et al., 2002; Meux et al., 2011). Accordingly, most if not all GSTLs, GHRs, GSTOs and DHARs characterized so far exhibit thiol-transferase and DHAR activities but no transferase, peroxidase or isomerase activities except for a Beta GST from *Proteus mirabilis*, which possesses a slight peroxidase activity on cumene hydroperoxide (k_{cat} around 0.01 s^{-1}) and a non-negligible GSH transferase activity on CDNB (k_{cat} around 2 s^{-1}) (**Table 5**) (Federici et al., 2010). This was surprising since the transferase, peroxidase or isomerase activities are usually specific to Ser- or Tyr-containing GSTs as Phi, Tau, and Zeta GSTs. Indeed, it necessitates the activation of thiolate form of glutathione for direct glutathionylation reaction toward non-conjugated substrates (Dirr et al., 1994; Armstrong, 1997; Roxas et al., 1997). In the absence of known physiological substrates, hydroxyl-ethyl disulfide (HED), and DHA are often used to characterize the activity of recombinant GSTs as well as glutaredoxins, but it turns out that most glutathione-dependent oxidoreductases display such activities with very similar kinetic parameters (**Table 5**). The only notable exception is DHARs, for which DHA reduction is truly relevant. Consistently, they reduce DHA into ascorbate with a better efficiency (k_{cat} around 10^4 s^{-1}, k_{cat}/K_m around 10^7 $M^{-1}.s^{-1}$) compared to the other enzymes (k_{cat} around 10^2 s^{-1}) and to the reduction of glutathionylated-mercaptoethanol, the product formed upon incubation between GSH and HED (k_{cat} around 10^2 s^{-1}) (**Table 5**) (Dixon et al., 2002). The DHAR-mediated DHA

Table 5 | Enzymatic and ligandin activities detected for Cys-GSTs.

		GSTL	DHAR	GHR	mPGES-2	GSTB	GSTO
Thiol-transferase		$10–10^{2}$ [abc]	$10–10^{2}$ [a]	$10^{2}–10^{3}$ [e]	?	?	$10^{2}–10^{3}$ [egm]
DHA reductase		$10–10^{2}$ [abc]	$10^{3}–10^{4}$ [abd]	$10–10^{2}$ [e]	?	?	$10–10^{3}$ [egm]
Glutathionylation		nd [ac]	nd [a]	nd [e]	?	$10–10^{3}$ [ij]	nd–1 [m]
Deglutathionylation	PAP-SG	$10^{2}–10^{3}$ [c]	?	nd [e]	?	?	$10^{3}–10^{4}$ *** [gmn]
	(Cl)Qui-SG	nd [c]	?	$10^{2}–10^{3}$ [ef]	?	?	nd [g]
	TET-SG	nd [c]	?	?	?	?	10^{3} [g]
	Q-SG	$1–10^{2}$ [bc]	?	?	?	?	?
PGH_2 isomerization		?	?	?	10^{2} * [h]	?	?
PGH_2 degradation		?	?	?	10^{3} ** [h]	?	?
Peroxidase		nd [ac]	nd [a]	nd [e]	?	0.1 [k]	nd [m]
Esterase		0.01–0.1 [c]	?	nd [g]	?	?	10 **** [g]
Ligandin		?	?	?		Antibiotics [kl]	Nitro-phenacyl glutathione [o] Tocopherol esters [p]

The data representing turnover numbers in min^{-1} have been extracted from the following references: [a] (Dixon et al., 2002); [b] (Dixon and Edwards, 2010b); [c] (Lallement et al., 2014); [d] (Tang and Yang, 2013); [e] (Meux et al., 2011); [f] (Lam et al., 2012); [g] (Meux et al., 2013); [h] (Yamada and Takusagawa, 2007); [i] (Allocati et al., 2000); [j] (Allocati et al., 2008); [k] (Perito et al., 1996); [l] (Allocati et al., 2009); [m] (Board et al., 2000); [n] (Board and Anders, 2007); [o] (Brock et al., 2013); [p] (Sampayo-Reyes and Zakharyan, 2006).

*Nd, not detected; ? not examined; *GSH-independent activity, **GSH-dependent activity, ***a slightly different substrate, acetophenone, was used (Board and Anders, 2007), ****k_{cat}/K_m in $mM^{-1}.min^{-1}$.*

reduction follows a ping-pong mechanism (Dixon et al., 2002; Shimaoka et al., 2003).

Based on several previous studies, a proposed catalytic mechanism that should apply for any glutathionylated substrate and any Cys-GST is presented in **Figure 6**. Since many Cys-GSTs characterized so far either structurally or biochemically have been shown to form mixed disulfides with GSH, there is little doubt that the catalytic cysteine performs a nucleophilic attack on GSH-conjugated substrates. The catalytic cysteine of Cys-GSTs becomes glutathionylated while the product of the reaction is released. The regeneration of these glutathionylated GST forms requires a GSH molecule, forming GSSG as another end product. While reduced Cys-GSTs are ready for another catalytic cycle, GSSG will be reduced back to GSH by glutathione reductase at the expense of NADPH. Since most Cys-GSTs have a single cysteine in the active site motif, they should follow this reaction mechanism. However, a few isoforms have an additional cysteine in the active site. This is the case of some DHAR isoforms which have CPFC active sites. For instance, *A. thaliana* DHAR3 was shown to form an intramolecular disulfide upon GSSG treatment by mass spectrometry (Dixon et al., 2002). Hence, it is possible that it constitutes either an intermediate step of the catalytic mechanism or possibly in other circumstances a protective mechanism that prevents over-oxidation of the catalytic cysteine into sulfenic, sulfinic, or sulfonic acid forms. Whatever the explanation is, the reduction of this disulfide would require a dithiol-disulfide exchange reaction. The most likely possibility is that it involves the successive intervention of two glutathione molecules, but another possibility is that a thioredoxin participates to this reduction step. Indeed, *A. thaliana* DHAR3 was isolated at least in two previous studies aiming at identifying thioredoxin targets (Marchand et al., 2004, 2006).

Besides glutathionylated-mercaptoethanol which contains a sulfur-sulfur bond, other glutathionylated substrates used so far have carbon-sulfur bonds (Meux et al., 2011, 2013; Lam et al., 2012; Lallement et al., 2014). For instance, beyond their DHAR activity, fungal and bacterial GHRs characterized so far efficiently reduce glutathionylated (chlorinated) (hydro)quinones with k_{cat} around 10^3 s^{-1} and k_{cat}/K_m up to 10^6 $M^{-1}.s^{-1}$ (**Table 5**) (Huang et al., 2008; Xun et al., 2010; Lam et al., 2012). However, there are some contrasting data in the literature. Some GHRs seem unable to catalyze the deglutathionylation of GSH conjugated-oxidized quinones and would be specific of glutathionylated reduced forms (Lam et al., 2012). On the other hand, using menadione as a substrate, a fungal GHR proved to deglutathionylate both forms with similar rates, but it is more efficient with the reduced forms because of a much better affinity (Meux et al., 2011). The latter observation points to the importance of the alcohol function for GHR recognition. Despite the above-mentioned discrepancy, it appears that GHRs are central to the regulation of the quinone redox state, likely preventing toxicity of quinones, either naturally present or found as environmental pollutants. Indeed, benzoquinones can covalently react with diverse macromolecules whereas hydroquinones, conjugated or not with glutathione, are prone to auto-oxidation forming reactive oxygen species. Since the major quinone forms found in the cells, ubiquinone and plastoquinone, are located into membranes and do not have electrophilic carbon groups that could be substituted by GSH, the question of the GHR physiological substrates is still open. Several other compounds often derived from lipids or fatty acids have alcohol functions and reactive electrophilic groups that might constitute possible substrates. As explained below, strategies aiming at identifying physiological substrates/ligands have been recently developed for other GSTs and they should be applied to GHRs. It is also possible that GHRs have protein substrates. For instance, it was proposed that the role of *S. cerevisiae* GTO1 could be related to the redox regulation of a Str3 cystathionine beta-lyase (Barreto et al., 2006). To date, the activity assays clearly separate GHRs from GSTLs and GSTOs which often catalyze the reduction of

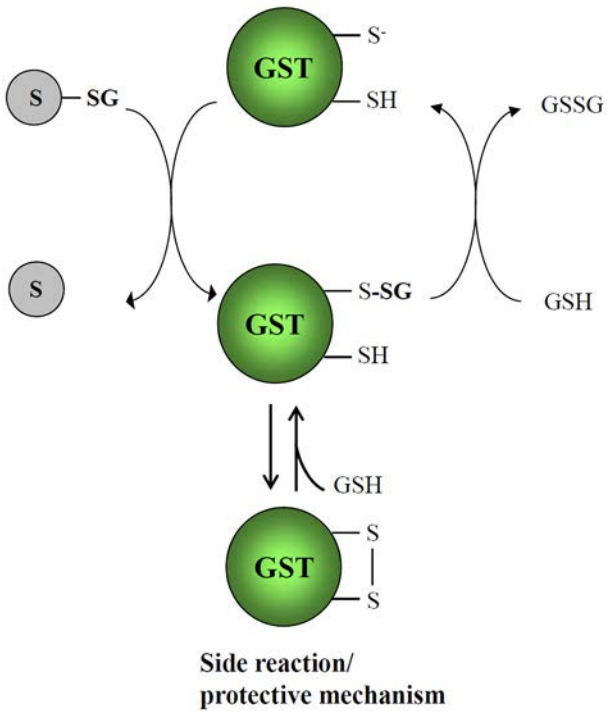


FIGURE 6 | Catalytic mechanisms of Cys-GSTs. The deglutathionylation of GSH-conjugated substrates occurs via the nucleophilic attack of the catalytic cysteine which is assumed to be at least partially under the thiolate form at physiological pH, owing to a decreased pKa value. Consequently, the catalytic cysteine is itself glutathionylated and it is regenerated using a glutathione molecule. For Cys-GSTs having another cysteine either in the active site (some DHAR isoforms) or at proximity (some GSTL isoforms), the identification of proteins with an intramolecular disulfide suggests that this might constitute either an intermediate step of the catalytic mechanism or more likely a protective mechanism that prevents oxidation of the catalytic cysteine into sulfenic acid forms or eventually higher oxidized forms as sulfinic or sulfonic acid forms. In the case of the formation of a disulfide an additional glutathione molecule would be required. It may be that thioredoxin participate to this reduction step as DHAR was isolated as a thioredoxin targets.

the same glutathionyl derivatives. GSTLs and GSTOs do not catalyze the deglutathionylation of glutathionylated quinones (Meux et al., 2013; Lallement et al., 2014). However, contrary to GHRs, GSTOs and GSTLs perform deglutathionylation of glutathionyl tetralone and/or acetophenone-derivatives with relatively good catalytic constants (k_{cat} around 10^4 s^{-1}) (**Table 5**) (Meux et al., 2013; Lallement et al., 2014) and they exhibit a weak esterase activity on the fluorescent probe chloromethyl fluorescein diacetate (CMFDA) (Meux et al., 2013; Lallement et al., 2014). This probe was initially used to identify tetralone as a GSTO substrate by competition experiments. Incidentally, one of the reported difference between GSTLs and GSTOs is that only GSTOs have the ability to remove the bound GSH molecule on glutathionyl tetralone (Meux et al., 2013; Lallement et al., 2014).

One of the major current challenge concerning Cys-GSTs and other GSTs is to identify relevant physiological substrates. One possibility to achieve this goal is to screen chemical libraries or cellular extracts by competition assays using fluorescent probes such as CFMDA or 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS). This has been successful in several cases both for Cys-GSTs (Son et al., 2010; Meux et al., 2013) and for those having a catalytic serine (Mathieu et al., 2012, 2013). Besides, Dixon and co-workers have identified several flavonoids derived from kaempferol which can bind tightly to GSTLs from Arabidopsis and wheat by ligand fishing approaches (Dixon and Edwards, 2010a). These approaches consist in isolating by affinity chromatographies and identifying natural physiological substrates from plants using *in vitro* and *in vivo* approaches. Both methods rely on the use of tagged proteins either by mixing them with crude or fractionated extracts or to secondary metabolite enriched-extracts, or by expressing them *in planta* in order to really trap physiological protein-substrate complexes. They proved to work also with Phi and Tau GSTs, the latter binding porphyrin intermediates and fatty acids (Dixon et al., 2008, 2011; Dixon and Edwards, 2009). It was then confirmed by enzymatic analyses that GSTLs from Arabidopsis, wheat and poplar can perform deglutathionylation of glutathionylated quercetin (Dixon and Edwards, 2010b; Lallement et al., 2014). However, the fact that the turnover numbers are quite low and similar to those obtained with other oxidoreductases (Grxs, Trxs, GSTOs, GHRs, and DHARs) from various organisms (Lallement et al., 2014) and that a quercetin derivative was also isolated from a ligand fishing experiment performed with a Phi GST (Dixon et al., 2011) raises the question of a specific role of GSTLs in quercetin recycling and in the maintenance of a reduced flavonoids pool. Overall, this may indicate that flavonoids are GST substrates, but it does not tell exactly which enzyme(s) is (are) really efficient *in vivo*.

From a biochemical point of view, mPGES-2 can hardly be compared with other Cys-GSTs. Indeed, although it has been shown that they do not display GSH transferase activity, none of the usual activities of Cys-GSTs were assayed (Watanabe et al., 1999). Since mammalian mPGES-2s have a defined role in prostanoid metabolism, all studies primarily investigated the PGH_2 conversion into PGE_2 (Watanabe et al., 1997). However, an issue was the observation that mPGES-2 activity was partially independent from glutathione and that DTT induced a 4-fold better efficiency of the proteins (Tanikawa et al., 2002). A recently solved structure of a heme-bound mPGES-2 allowed solving this discrepancy. Indeed, it seems that the isomerization activity is catalyzed by a heme-free enzyme, whereas heme-bound mPGES-2s can degrade PGH_2 into hydroxyl heptadecatrienoic acid and malondialdehyde, instead of converting it to PGE_2 (Jania et al., 2009; Takusagawa, 2013). This activity relies to the binding of a heme, which is stabilized by hydrogen bonds when a glutathione is present in the active site (Yamada and Takusagawa, 2007; Takusagawa, 2013). Hence, this may help explaining that the activity of isomerization is increased by adding DTT as it contributed to remove both GSH and heme from the active site. Overall, the current view in animals is that the physiological role of mPGES-2s is related to the degradation of PGH_2 rather than to its isomerization into PGE_2. This is also consistent with the fact that mPGES-1s also catalyze the GSH-dependent PGH_2 isomerization into PGE_2 with good efficiencies (Thoren et al., 2003). Since there is no PGH_2 and PGE_2 in plants, the physiological roles and substrates of mPGES-2 are unclear. Looking for

possible related candidate molecules in plants, oxylipins might constitute such substrates. Indeed, these molecules, derived from the enzymatic and non-enzymatic peroxidation of fatty acids, exhibit a reactive carbonyl structure, which makes them highly reactive electrophilic species and they are formed at proximity of mPGES-2 localization (Farmer and Mueller, 2013). These compounds participate to numerous developmental processes and to stress response. It is for instance documented that the expression of some GSTs is induced by 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), a phytohormone precursor, and phytoprostane A1 (PPA_1) (Mueller et al., 2008). Consequently, it was hypothesized that GSTs might reduce the reactive cyclopentenone ring to an unreactive ring. Hence, by glutathionylating or deglutathionylating these molecules, GSTs and possibly mPGES-2s could modulate the concerned signaling pathways. To conclude, although Cys-GSTs are encoded by multigenic families, there is a pressing need to perform reverse genetics by systematically generating single or multiple mutant lines or overexpressing lines to delineate the exact function of these proteins.

MATERIALS AND METHODS

SEQUENCE RETRIEVAL, STRUCTURAL ALIGNMENT AND PHYLOGENETIC ANALYSES

Sequences have been retrieved by iterative blastp analyses using a set of as variable GST sequences as possible either from the cyanobase (http://genome.microbedb.jp/cyanobase/) for cyanobacteria, from the jgi genome portal (http://genome.jgi.doe.gov/) for most algae and from the version 10 of the phytozome portal (http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html) for terrestrial plants. When needed and possible, sequences have been completed and validated by analyzing the presence of ESTs using tblastn analyses against the NCBI protein databank. Sequences were then aligned with PROMALS3D (http://prodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.php) (Pei et al., 2008) and alignment manually adjusted with Seaview software (Gouy et al., 2010). The phylogenetic tree was constructed with BioNJ (Gascuel, 1997) in Seaview and edited with Figtree software (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

SUBCELLULAR LOCALIZATION

The GST subcellular localization was defined based on the available literature, as well as from database mining using TAIR v10, and from the following prediction softwares, Predotar, TargetP, and Wolfpsort.

EXPRESSION ANALYSES

For developmental conditions, expression data from Gene Expression Map of Arabidopsis Development (Schmid et al., 2005) were retrieved using the eFP browser (Winter et al., 2007). Each gene was normalized to its maximum expression within the selected dataset. Further, the number of developmental conditions was reduced to eight classes in order to gain a better overview of the overall expression profile of each GST during Arabidopsis development. These classes were grouped together and their relative expression averaged as follows: Mature seeds (stages 8, 9, and 10 without siliques and dry seed), Developing seeds (stages 3, 4, and 5 with siliques), Pollen (mature), Flowers (stages 9, 10/11, 12, and 15), Senescing leaves, Leaves (rosette leaves 4, 6, 8, and 10), Shoot Apices (vegetative, transition, and inflorescence), and Roots (from seedlings and mature rosettes).

For perturbation conditions, expression data for each GST were obtained from Genevestigator V3 (Hruz et al., 2008). Only data with a p-value < 0.001 were included in the analysis. Perturbations in the resulting lists were grouped into 11 classes: Biotic stress (Bs), Chemicals (Che), Germination (Ge), Light (Li), N-starvation (-N), Fe-deficiency (-Fe), Salt stress (Sa), Hypoxia (Hy), Drought (Dr), Heat (He), and Cold (Co).

Data were analyzed using Open Office Calc (Apache), graphed using PRISM (GraphPad) and clustered using Multi-experiment Viewer (MeV).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Pierre-Alexandre Lallement, Arnaud Hecker, and Nicolas Rouhier carried out the *in silico* genome analyses. Bastiaan Brouwer and Olivier Keech performed the transcriptome and subcellular prediction analyses. All authors participated to the writing of the manuscript, have read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The UMR1136 is supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fphar.2014.00192/abstract

REFERENCES

Aceto, A., Sacchetta, P., Dragani, B., Bucciarelli, T., Angelucci, S., Longo, V., et al. (1993). Glutathione transferase isoenzymes in olfactory and respiratory epithelium of cattle. *Biochem. Pharmacol.* 46, 2127–2133. doi: 10.1016/0006-2952(93)90600-2

Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Ceccarelli, I., Carletti, E., Parker, M. W., et al. (1999). Functional analysis of the evolutionarily conserved proline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1. *FEBS Lett.* 445, 347–350. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00147-7

Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Polekhina, G., Rossjohn, J., Parker, M. W., et al. (2000). Evaluation of the role of two conserved active-site residues in beta class glutathione S-transferases. *Biochem. J.* 351 Pt 2, 341–346. doi: 10.1042/0264-6021:3510341

Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., and Di Ilio, C. (2009). Glutathione transferases in bacteria. *FEBS J.* 276, 58–75. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06743.x

Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., Favaloro, B., and Di Ilio, C. (2008). Cysteine 10 is critical for the activity of *Ochrobactrum anthropi* glutathione transferase and its mutation to alanine causes the preferential binding of glutathione to the H-site. *Proteins* 71, 16–23. doi: 10.1002/prot.21835

Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 2–18. doi: 10.1021/tx960072x

Atkinson, H. J., and Babbitt, P. C. (2009). Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry* 48, 11108–11116. doi: 10.1021/bi901180v

Axarli, I. A., Rigden, D. J., and Labrou, N. E. (2004). Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I. *Biochem. J.* 382, 885–893. doi: 10.1042/BJ20040298

Barreto, L., Garcera, A., Jansson, K., Sunnerhagen, P., and Herrero, E. (2006). A peroxisomal glutathione transferase of *Saccharomyces cerevisiae* is functionally related to sulfur amino acid metabolism. *Eukaryotic Cell* 5, 1748–1759. doi: 10.1128/EC.00216-06

Board, P. G. (2011). The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics. *Drug Metab. Rev.* 43, 226–235. doi: 10.3109/03602532.2011.561353

Board, P. G., and Anders, M. W. (2007). Glutathione transferase omega 1 catalyzes the reduction of S-(phenacyl)glutathiones to acetophenones. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 149–154. doi: 10.1021/tx600305y

Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L. S., Schulte, G. K., et al. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275, 24798–24806. doi: 10.1074/jbc.M001706200

Bresell, A., Weinander, R., Lundqvist, G., Raza, H., Shimoji, M., Sun, T. H., et al. (2005). Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS J.* 272, 1688–1703. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04596.x

Brock, J., Board, P. G., and Oakley, A. J. (2013). Structural insights into omega-class glutathione transferases: a snapshot of enzyme reduction and identification of a non-catalytic ligandin site. *PLoS ONE* 8:e60324. doi: 10.1371/journal.pone.0060324

Burmeister, C., Luersen, K., Heinick, A., Hussein, A., Domagalski, M., Walter, R. D., et al. (2008). Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: protective effects of the Omega class glutathione transferase (GSTO-1). *FASEB J.* 22, 343–354. doi: 10.1096/fj.06-7426com

Chen, B. Y., Ma, X. X., Guo, P. C., Tan, X., Li, W. F., Yang, J. P., et al. (2011). Structure-guided activity restoration of the silkworm glutathione transferase Omega GSTO3-3. *J. Mol. Biol.* 412, 204–211. doi: 10.1016/j.jmb.2011.07.019

Chew, O., Whelan, J., and Millar, A. H. (2003). Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J. Biol. Chem.* 278, 46869–46877. doi: 10.1074/jbc.M307525200

Chronopoulou, E. G., and Labrou, N. E. (2009). Glutathione transferases: emerging multidisciplinary tools in red and green biotechnology. *Recent Pat. Biotechnol.* 3, 211–223. doi: 10.2174/187220809789389135

Coleman, J., Blake-Kalff, M., and Davies, E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* 2, 144–151. doi: 10.1016/S1360-1385(97)01019-4

Cromer, B. A., Gorman, M. A., Hansen, G., Adams, J. J., Coggan, M., Littler, D. R., et al. (2007). Structure of the Janus protein human CLIC2. *J. Mol. Biol.* 374, 719–731. doi: 10.1016/j.jmb.2007.09.041

Csiszar, J., Horvath, E., Vary, Z., Galle, A., Bela, K., Brunner, S., et al. (2014). Glutathione transferase supergene family in tomato: SAlt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid. *Plant Physiol. Biochem.* 78, 15–26. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.02.010

Davoine, C., Douki, T., Iacazio, G., Montillet, J. L., and Triantaphylides, C. (2005). Conjugation of keto fatty acids to glutathione in plant tissues. Characterization and quantification by HPLC-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 7366–7372. doi: 10.1021/ac051155y

Debat, H., Eloit, C., Blon, F., Sarazin, B., Henry, C., Huet, J. C., et al. (2007). Identification of human olfactory cleft mucus proteins using proteomic analysis. *J. Proteome Res.* 6, 1985–1996. doi: 10.1021/pr0606575

Dirr, H., Reinemer, P., and Huber, R. (1994). X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur. J. Biochem.* 220, 645–661. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18666.x

Dixon, D. P., Davis, B. G., and Edwards, R. (2002). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277, 30859–30869. doi: 10.1074/jbc.M202919200

Dixon, D. P., and Edwards, R. (2009). Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 284, 21249–21256. doi: 10.1074/jbc.M109.020107

Dixon, D. P., and Edwards, R. (2010a). Glutathione transferases. *Arabidopsis Book* 8:e0131. doi: 10.1199/tab.0131

Dixon, D. P., and Edwards, R. (2010b). Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *J. Biol. Chem.* 285, 36322–36329. doi: 10.1074/jbc.M110.164806

Dixon, D. P., Hawkins, T., Hussey, P. J., and Edwards, R. (2009). Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *J. Exp. Bot.* 60, 1207–1218. doi: 10.1093/jxb/ern365

Dixon, D. P., Lapthorn, A., Madesis, P., Mudd, E. A., Day, A., and Edwards, R. (2008). Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 283, 20268–20276. doi: 10.1074/jbc.M802026200

Dixon, D. P., Sellars, J. D., and Edwards, R. (2011). The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. *Biochem. J.* 438, 63–70. doi: 10.1042/BJ20101884

Farmer, E. E., and Mueller, M. J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 429–450. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120132

Federici, L., Masulli, M., Bonivento, D., Di Matteo, A., Gianni, S., Favaloro, B., et al. (2007). Role of Ser11 in the stabilization of the structure of *Ochrobactrum anthropi* glutathione transferase. *Biochem. J.* 403, 267–274. doi: 10.1042/BJ20061707

Federici, L., Masulli, M., Di Ilio, C., and Allocati, N. (2010). Characterization of the hydrophobic substrate-binding site of the bacterial beta class glutathione transferase from *Proteus mirabilis*. *Protein Eng. Des. Sel.* 23, 743–750. doi: 10.1093/protein/gzq048

Fedrizzi, B., Guella, G., Perenzoni, D., Gasperotti, M., Masuero, D., Vrhovsek, U., et al. (2012). Identification of intermediates involved in the biosynthetic pathway of 3-mercaptohexan-1-ol conjugates in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa). *Phytochemistry* 77, 287–293. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.01.017

Fernandez-Canon, J. M., Baetscher, M. W., Finegold, M., Burlingame, T., Gibson, K. M., and Grompe, M. (2002). Maleylacetoacetate isomerase (MAAI/GSTZ)-deficient mice reveal a glutathione-dependent nonenzymatic bypass in tyrosine catabolism. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4943–4951. doi: 10.1128/MCB.22.13.4943-4951.2002

Ferro, M., Brugiere, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Court, M., Moyet, L., et al. (2010). AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 1063–1084. doi: 10.1074/mcp.M900325-MCP200

Frova, C. (2006). Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23, 149–169. doi: 10.1016/j.bioeng.2006.05.020

Fyfe, P. K., Westrop, G. D., Silva, A. M., Coombs, G. H., and Hunter, W. N. (2012). Leishmania TDR1 structure, a unique trimeric glutathione transferase capable of deglutathionylation and antimonial prodrug activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11693–11698. doi: 10.1073/pnas.1202593109

Gascuel, O. (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 14, 685–695. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025808

Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. doi: 10.1093/molbev/msp259

Green, A. R., Hayes, R. P., Xun, L., and Kang, C. (2012). Structural understanding of the glutathione-dependent reduction mechanism of glutathionyl-hydroquinone reductases. *J. Biol. Chem.* 287, 35838–35848. doi: 10.1074/jbc.M112.395541

Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., and Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J.* 64, 355–365. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04322.x

Gutscher, M., Pauleau, A. L., Marty, L., Brach, T., Wabnitz, G. H., Samstag, Y., et al. (2008). Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat. Methods* 5, 553–559. doi: 10.1038/nmeth.1212

Harrop, S. J., Demaere, M. Z., Fairlie, W. D., Reztsova, T., Valenzuela, S. M., Mazzanti, M., et al. (2001). Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-A resolution. *J. Biol. Chem.* 276, 44993–45000. doi: 10.1074/jbc.M107804200

Heazlewood, J. L., Tonti-Filippini, J. S., Gout, A. M., Day, D. A., Whelan, J., and Millar, A. H. (2004). Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16, 241–256. doi: 10.1105/tpc.016055

Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., et al. (2008). Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinformatics* 2008:420747. doi: 10.1155/2008/420747

Hu, T., He, S., Yang, G., Zeng, H., Wang, G., Chen, Z., et al. (2011a). Isolation and characterization of a rice glutathione S-transferase gene promoter regulated by herbicides and hormones. *Plant Cell Rep.* 30, 539–549. doi: 10.1007/s00299-010-0964-z

Hu, T., Qv, X., Xiao, G., and Huang, X. (2009). Enhanced tolerance to herbicide of rice plants by over-expression of a glutathione S-transferase. *Mol. Breed.* 24, 409–418. doi: 10.1007/s11032-009-9302-y

Hu, T. Z., He, S., Huang, X. Y., Deng, L., and Wang, G. X. (2011b). Cloning, molecular characterization and heterologous expression of a glutathione S-transferase gene in rice. *Bioorg. Khim.* 37, 386–392. doi: 10.1134/S1068162011030174

Huang, Y., Xun, R., Chen, G., and Xun, L. (2008). Maintenance role of a glutathionyl-hydroquinone lyase (PcpF) in pentachlorophenol degradation by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *J. Bacteriol.* 190, 7595–7600. doi: 10.1128/JB.00489-08

Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B., and Williamson, G. (1998). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. *Biochem. J.* 332 (Pt 1), 97–100.

Ito, J., Batth, T. S., Petzold, C. J., Redding-Johanson, A. M., Mukhopadhyay, A., Verboom, R., et al. (2011). Analysis of the Arabidopsis cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism. *J. Proteome Res.* 10, 1571–1582. doi: 10.1021/pr1009433

Jania, L. A., Chandrasekharan, S., Backlund, M. G., Foley, N. A., Snouwaert, J., Wang, I. M., et al. (2009). Microsomal prostaglandin E synthase-2 is not essential for *in vivo* prostaglandin E2 biosynthesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 88, 73–81. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2008.10.003

Kim, J., Suh, H., Kim, S., Kim, K., Ahn, C., and Yim, J. (2006). Identification and characteristics of the structural gene for the Drosophila eye colour mutant sepia, encoding PDA synthase, a member of the omega class glutathione S-transferases. *Biochem. J.* 398, 451–460. doi: 10.1042/BJ20060424

Kitamura, S., Shikazono, N., and Tanaka, A. (2004). TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis. *Plant J.* 37, 104–114. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01943.x

Klodmann, J., Senkler, M., Rode, C., and Braun, H. P. (2011). Defining the protein complex proteome of plant mitochondria. *Plant Physiol.* 157, 587–598. doi: 10.1104/pp.111.182352

Kong, G. K., Polekhina, G., McKinstry, W. J., Parker, M. W., Dragani, B., Aceto, A., et al. (2003). Contribution of glycine 146 to a conserved folding module affecting stability and refolding of human glutathione transferase p1-1. *J. Biol. Chem.* 278, 1291–1302. doi: 10.1074/jbc.M209581200

Kumar, S., Asif, M., Chakrabarty, D., Tripathi, R., Dubey, R., and Trivedi, P. (2013a). Differential expression of rice lambda class GST gene family members during plant growth, development, and in response to stress conditions. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31, 569–580. doi: 10.1007/s11105-012-0524-5

Kumar, S., Asif, M. H., Chakrabarty, D., Tripathi, R. D., Dubey, R. S., and Trivedi, P. K. (2013b). Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, OsGSTL2, in Arabidopsis provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses. *J. Hazard. Mater.* 248–249, 228–237. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.01.004

Lallement, P. A., Meux, E., Gualberto, J. M., Prosper, P., Didierjean, C., Saul, F., et al. (2014). Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from Populus trichocarpa, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. *Biochem J.* 462, 39–52. doi: 10.1042/BJ20140390

Lam, L. K., Zhang, Z., Board, P. G., and Xun, L. (2012). Reduction of benzoquinones to hydroquinones via spontaneous reaction with glutathione and enzymatic reaction by S-glutathionyl-hydroquinone reductases. *Biochemistry* 51, 5014–5021. doi: 10.1021/bi300477z

Lamoureux, G. L., Shimabukuro, R. H., Swanson, H. R., and Frear, D. S. (1970). Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections. *J. Agric. Food Chem.* 18, 81–86. doi: 10.1021/jf60167a029

Lan, T., Wang, X. R., and Zeng, Q. Y. (2013). Structural and functional evolution of positively selected sites in pine glutathione S-transferase enzyme family. *J. Biol. Chem.* 288, 24441–24451. doi: 10.1074/jbc.M113.456863

Lan, T., Yang, Z. L., Yang, X., Liu, Y. J., Wang, X. R., and Zeng, Q. Y. (2009). Extensive functional diversification of the Populus glutathione S-transferase supergene family. *Plant Cell* 21, 3749–3766. doi: 10.1105/tpc.109.070219

Lewis, K., and Ausubel, F. M. (2006). Prospects for plant-derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.* 24, 1504–1507. doi: 10.1038/nbt1206-1504

Lister, R., Carrie, C., Duncan, O., Ho, L. H., Howell, K. A., Murcha, M. W., et al. (2007). Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria. *Plant Cell* 19, 3739–3759. doi: 10.1105/tpc.107.050534

Littler, D. R., Brown, L. J., Breit, S. N., Perrakis, A., and Curmi, P. M. (2010). Structure of human CLIC3 at 2 A resolution. *Proteins* 78, 1594–1600. doi: 10.1002/prot.22675

Littler, D. R., Harrop, S. J., Brown, L. J., Pankhurst, G. J., Mynott, A. V., Luciani, P., et al. (2008). Comparison of vertebrate and invertebrate CLIC proteins: the crystal structures of *Caenorhabditis elegans* EXC-4 and *Drosophila melanogaster* DmCLIC. *Proteins* 71, 364–378. doi: 10.1002/prot.21704

Littler, D. R., Harrop, S. J., Fairlie, W. D., Brown, L. J., Pankhurst, G. J., Pankhurst, S., et al. (2004). The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition. *J. Biol. Chem.* 279, 9298–9305. doi: 10.1074/jbc.M308444200

Litwack, G., Ketterer, B., and Arias, I. M. (1971). Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature* 234, 466–467. doi: 10.1038/234466a0

Liu, Y. J., Han, X. M., Ren, L. L., Yang, H. L., and Zeng, Q. Y. (2013). Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants. *Plant Physiol.* 161, 773–786. doi: 10.1104/pp.112.205815

Marchand, C., Le Marechal, P., Meyer, Y., and Decottignies, P. (2006). Comparative proteomic approaches for the isolation of proteins interacting with thioredoxin. *Proteomics* 6, 6528–6537. doi: 10.1002/pmic.200600443

Marchand, C., Le Marechal, P., Meyer, Y., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E., and Decottignies, P. (2004). New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* 4, 2696–2706. doi: 10.1002/pmic.200400805

Marmagne, A., Ferro, M., Meinnel, T., Bruley, C., Kuhn, L., Garin, J., et al. (2007). A high content in lipid-modified peripheral proteins and integral receptor kinases features in the arabidopsis plasma membrane proteome. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1980–1996. doi: 10.1074/mcp.M700099-MCP200

Marrs, K. A. (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127–158. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.127

Masai, E., Ichimura, A., Sato, Y., Miyauchi, K., Katayama, Y., and Fukuda, M. (2003). Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether. *J. Bacteriol.* 185, 1768–1775. doi: 10.1128/JB.185.6.1768-1775.2003

Mathieu, Y., Prosper, P., Buee, M., Dumarcay, S., Favier, F., Gelhaye, E., et al. (2012). Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. *J. Biol. Chem.* 287, 39001–39011. doi: 10.1074/jbc.M112.402776

Mathieu, Y., Prosper, P., Favier, F., Harvengt, L., Didierjean, C., Jacquot, J. P., et al. (2013). Diversification of fungal specific class a glutathione transferases in saprotrophic fungi. *PLoS ONE* 8:e80298. doi: 10.1371/journal.pone.0080298

McTigue, M. A., Williams, D. R., and Tainer, J. A. (1995). Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J. Mol. Biol.* 246, 21–27. doi: 10.1006/jmbi.1994.0061

Menon, D., and Board, P. G. (2013). A role for glutathione transferase Omega 1 (GSTO1-1) in the glutathionylation cycle. *J. Biol. Chem.* 288, 25769–25779. doi: 10.1074/jbc.M113.487785

Meux, E., Morel, M., Lamant, T., Gerardin, P., Jacquot, J. P., Dumarcay, S., et al. (2013). New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases. *Biochimie* 95, 336–346. doi: 10.1016/j.biochi.2012.10.003

Meux, E., Prosper, P., Masai, E., Mulliert, G., Dumarcay, S., Morel, M., et al. (2012). Sphingobium sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathione transferase omega class. *FEBS Lett.* 586, 3944–3950. doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.036

Meux, E., Prosper, P., Ngadin, A., Didierjean, C., Morel, M., Dumarcay, S., et al. (2011). Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class. *J. Biol. Chem.* 286, 9162–9173. doi: 10.1074/jbc.M110.194548

Meyer, Y., Vignols, F., and Reichheld, J. P. (2002). Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* 347, 394–402. doi: 10.1016/S0076-6879(02)47039-5

Mitra, S. K., Walters, B. T., Clouse, S. D., and Goshe, M. B. (2009). An efficient organic solvent based extraction method for the proteomic analysis of Arabidopsis plasma membranes. *J. Proteome Res.* 8, 2752–2767. doi: 10.1021/pr801044y

Moons, A. (2005). Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitam. Horm.* 72, 155–202. doi: 10.1016/S0083-6729(05)72005-7

Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., et al. (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microb. Biotechnol.* 6, 248–263. doi: 10.1111/1751-7915.12015

Morel, M., Ngadin, A. A., Droux, M., Jacquot, J. P., and Gelhaye, E. (2009). The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3711–3725. doi: 10.1007/s00018-009-0104-5

Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M. J., et al. (2008). General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 768–785. doi: 10.1105/tpc.107.054809

Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., et al. (2003). Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 278, 37937–37947. doi: 10.1074/jbc.M305108200

Nishida, M., Harada, S., Noguchi, S., Satow, Y., Inoue, H., and Takahashi, K. (1998). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* glutathione S-transferase complexed with glutathione sulfonate: catalytic roles of Cys10 and His106. *J. Mol. Biol.* 281, 135–147. doi: 10.1006/jmbi.1998.1927

Oakley, A. J., Harnnoi, T., Udomsinprasert, R., Jirajaroenrat, K., Ketterman, A. J., and Wilce, M. C. (2001). The crystal structures of glutathione S-transferases isozymes 1-3 and 1-4 from Anopheles dirus species B. *Protein Sci.* 10, 2176–2185. doi: 10.1110/ps.ps.21201

Pallardo, F. V., Markovic, J., Garcia, J. L., and Vina, J. (2009). Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol. Aspects Med.* 30, 77–85. doi: 10.1016/j.mam.2009.01.001

Pei, J., Kim, B. H., and Grishin, N. V. (2008). PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res.* 36, 2295–2300. doi: 10.1093/nar/gkn072

Peltier, J. B., Cai, Y., Sun, Q., Zabrouskov, V., Giacomelli, L., Rudella, A., et al. (2006). The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 114–133. doi: 10.1074/mcp.M500180-MCP200

Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J., and Ferreira, V. (2012). S-Cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors in grapes. A review. *Food Chem.* 131, 1–13. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.079

Perito, B., Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Dragani, B., Polsinelli, M., et al. (1996). Molecular cloning and overexpression of a glutathione transferase gene from *Proteus mirabilis*. *Biochem. J.* 318 (Pt 1), 157–162.

Reddy, G. V., and Gold, M. H. (2001). Purification and characterization of glutathione conjugate reductase: a component of the tetrachlorohydroquinone reductive dehalogenase system from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 391, 271–277. doi: 10.1006/abbi.2001.2417

Reumann, S., Quan, S., Aung, K., Yang, P., Manandhar-Shrestha, K., Holbrook, D., et al. (2009). In-depth proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes combined with *in vivo* subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. *Plant Physiol.* 150, 125–143. doi: 10.1104/pp.109.137703

Rezaei, M. K., Shobbar, Z. S., Shahbazi, M., Abedini, R., and Zare, S. (2013). Glutathione S-transferase (GST) family in barley: identification of members, enzyme activity, and gene expression pattern. *J. Plant Physiol.* 170, 1277–1284. doi: 10.1016/j.jplph.2013.04.005

Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (1988). Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science* 240, 1648–1652. doi: 10.1126/science.3381086

Rossjohn, J., Polekhina, G., Feil, S. C., Allocati, N., Masulli, M., Di Illio, C., et al. (1998). A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications. *Structure* 6, 721–734. doi: 10.1016/S0969-2126(98)00074-4

Rouhier, N., Couturier, J., and Jacquot, J. P. (2006). Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. *J. Exp. Bot.* 57, 1685–1696. doi: 10.1093/jxb/erl001

Rouhier, N., and Jacquot, J. P. (2005). The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1413–1421. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.037

Rouhier, N., 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, 143–166. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092811

Roxas, V. P., Smith, R. K. Jr., Allen, E. R., and Allen, R. D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* 15, 988–991. doi: 10.1038/nbt1097-988

Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N., et al. (2010). Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.* 27, 238–254. doi: 10.1039/b916096e

Sampayo-Reyes, A., and Zakharyan, R. A. (2006). Tocopherol esters inhibit human glutathione S-transferase omega. *Acta Biochim. Pol.* 53, 547–552.

Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., et al. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* 37, 501–506. doi: 10.1038/ng1543

Selles, B., Jacquot, J. P., and Rouhier, N. (2011). Comparative genomic study of protein disulfide isomerases from photosynthetic organisms. *Genomics* 97, 37–50. doi: 10.1016/j.ygeno.2010.10.001

Shimaoka, T., Miyake, C., and Yokota, A. (2003). Mechanism of the reaction catalyzed by dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 270, 921–928. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03452.x

Smith, A. P., Nourizadeh, S. D., Peer, W. A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A. S., et al. (2003). Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant J.* 36, 433–442. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01890.x

Son, J., Lee, J. J., Lee, J. S., Schuller, A., and Chang, Y. T. (2010). Isozyme-specific fluorescent inhibitor of glutathione s-transferase omega 1. *ACS Chem. Biol.* 5, 449–453. doi: 10.1021/cb100007s

Stevens, J. M., Armstrong, R. N., and Dirr, H. W. (2000). Electrostatic interactions affecting the active site of class sigma glutathione S-transferase. *Biochem. J.* 347 Pt 1, 193–197. doi: 10.1042/0264-6021:3470193

Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., et al. (2011). Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 364–380. doi: 10.1105/tpc.110.079145

Takusagawa, F. (2013). Microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES2) is a glutathione-dependent heme protein, and dithiothreitol dissociates the bound heme to produce active prostaglandin E2 synthase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 288, 10166–10175. doi: 10.1074/jbc.M112.418475

Tang, A. H., and Tu, C. P. (1994). Biochemical characterization of Drosophila glutathione S-transferases D1 and D21. *J. Biol. Chem.* 269, 27876–27884.

Tang, Z. X., and Yang, H. L. (2013). Functional divergence and catalytic properties of dehydroascorbate reductase family proteins from *Populus tomentosa*. *Mol. Biol. Rep.* 40, 5105–5114. doi: 10.1007/s11033-013-2612-5

Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., et al. (2002). Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 884–889. doi: 10.1006/bbrc.2002.6531

Tew, K. D. (2005). TLK-286: a novel glutathione S-transferase-activated prodrug. *Expert Opin. Investig. Drugs* 14, 1047–1054. doi: 10.1517/13543784.14.8.1047

Thom, R., Cummins, I., Dixon, D. P., Edwards, R., Cole, D. J., and Lapthorn, A. J. (2002). Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochemistry* 41, 7008–7020. doi: 10.1021/bi015964x

Thom, R., Dixon, D. P., Edwards, R., Cole, D. J., and Lapthorn, A. J. (2001). The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *J. Mol. Biol.* 308, 949–962. doi: 10.1006/jmbi.2001.4638

Thoren, S., Weinander, R., Saha, S., Jegerschold, C., Pettersson, P. L., Samuelsson, B., et al. (2003). Human microsomal prostaglandin E synthase-1: purification, functional characterization, and projection structure determination. *J. Biol. Chem.* 278, 22199–22209. doi: 10.1074/jbc.M303227200

Tocheva, E. I., Fortin, P. D., Eltis, L. D., and Murphy, M. E. (2006). Structures of ternary complexes of BphK, a bacterial glutathione S-transferase that

reductively dechlorinates polychlorinated biphenyl metabolites. *J. Biol. Chem.* 281, 30933–30940. doi: 10.1074/jbc.M603125200

Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., et al. (2010). The genome of the domesticated apple (Malus x domestica Borkh.). *Nat. Genet.* 42, 833–839. doi: 10.1038/ng.654

Watanabe, K., Kurihara, K., and Suzuki, T. (1999). Purification and characterization of membrane-bound prostaglandin E synthase from bovine heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 406–414. doi: 10.1016/S1388-1981(99)00084-0

Watanabe, K., Kurihara, K., Tokunaga, Y., and Hayaishi, O. (1997). Two types of microsomal prostaglandin E synthase: glutathione-dependent and -independent prostaglandin E synthases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 148–152. doi: 10.1006/bbrc.1997.6708

Wilce, M. C., and Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1205, 1–18. doi: 10.1016/0167-4838(94)90086-8

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., and Provart, N. J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* 2:e718. doi: 10.1371/journal.pone.0000718

Xia, B., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2001). Solution structure of *Escherichia coli* glutaredoxin-2 shows similarity to mammalian glutathione-S-transferases. *J. Mol. Biol.* 310, 907–918. doi: 10.1006/jmbi.2001.4721

Xun, L., Belchik, S. M., Xun, R., Huang, Y., Zhou, H., Sanchez, E., et al. (2010). S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases. *Biochem. J.* 428, 419–427. doi: 10.1042/BJ20091863

Yamada, T., Komoto, J., Watanabe, K., Ohmiya, Y., and Takusagawa, F. (2005). Crystal structure and possible catalytic mechanism of microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES-2). *J. Mol. Biol.* 348, 1163–1176. doi: 10.1016/j.jmb.2005.03.035

Yamada, T., and Takusagawa, F. (2007). PGH2 degradation pathway catalyzed by GSH-heme complex bound microsomal prostaglandin E2 synthase type 2: the first example of a dual-function enzyme. *Biochemistry* 46, 8414–8424. doi: 10.1021/bi700605m

Yamamoto, K., Nagaoka, S., Banno, Y., and Aso, Y. (2009). Biochemical properties of an omega-class glutathione S-transferase of the silkmoth, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 149, 461–467. doi: 10.1016/j.cbpc.2008.10.108

Yang, H. L., Zhao, Y. R., Wang, C. L., Yang, Z. L., Zeng, Q. Y., and Lu, H. (2009). Molecular characterization of a dehydroascorbate reductase from *Pinus bungeana*. *J. Integr. Plant Biol.* 51, 993–1001. doi: 10.1111/j.1744-7909.2009.00848.x

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

Zakharyan, R. A., Sampayo-Reyes, A., Healy, S. M., Tsaprailis, G., Board, P. G., Liebler, D. C., et al. (2001). Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1051–1057. doi: 10.1021/tx010052h

Zhou, H., Brock, J., Liu, D., Board, P. G., and Oakley, A. J. (2012). Structural insights into the dehydroascorbate reductase activity of human omega-class glutathione transferases. *J. Mol. Biol.* 420, 190–203. doi: 10.1016/j.jmb.2012.04.014

Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., et al. (2008). Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* 3:e1994. doi: 10.1371/journal.pone.0001994

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

Received: 13 June 2014; accepted: 26 July 2014; published online: 20 August 2014.

*Citation: Lallement P-A, Brouwer B, Keech O, Hecker A and Rouhier N (2014) The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. Front. Pharmacol. **5**:192. doi: 10.3389/fphar.2014.00192*

This article was submitted to Experimental Pharmacology and Drug Discovery, a section of the journal Frontiers in Pharmacology.

Copyright © 2014 Lallement, Brouwer, Keech, Hecker and Rouhier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2. **Article 3 : Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants**

Pierre-Alexandre Lallement, Edgar Meux, José M. Gualberto, Pascalita Prosper, Claude Didierjean, Frederick Saul, Ahmed Haouz, Nicolas Rouhier et Arnaud Hecker

The Biochemical Journal, 2014, **462**, 39–52

Les GSTLs de *P. trichocarpa* sont codées par trois gènes qui ont été appelés *PtGSTL1*, *PtGSTL2* et *PtGSTL3*. Cependant, deux transcrits se distinguant par leurs extrémités 5' ont été identifiés pour *PtGSTL3*. L'étude des patrons d'expression a montré que les gènes sont peu exprimés dans les feuilles et les racines par rapport aux fleurs, fruits, pétioles et bourgeons, ce qui suggère des rôles associés au métabolisme secondaire plutôt dans ces derniers organes. L'expression des gènes correspondants fusionnés à une séquence codant une protéine fluorescente (GFP) a montré chez le tabac que la protéine PtGSTL1 se localise dans les plastes, tandis que les protéines PtGSTL2, PtGSTL3A et PtGSTL3B sont adressées à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Les structures des protéines PtGSTL1 et PtGSTL3 complexées à du GSH, obtenues par des méthodes de cristallogenèse et de diffraction aux rayons X, montrent que ces protéines adoptent le repliement caractéristique des GSTs canoniques proche de celui des GSTs de la classe Oméga mais que, contrairement à ces dernières qui sont dimériques, les GSTLs sont monomériques. Ces différences structurales pourraient notamment expliquer certaines différences dans les propriétés enzymatiques des deux types d'enzymes. En effet, bien que les GSTLs soient capables de déglutathionyler la quercétine (flavonoïde abondant chez les plantes) et la phényl-acétophénone, ce n'est pas le cas pour la tétralone contrairement aux GSTOs. De plus, à l'inverse des GHRs, elles ne catalysent pas la déglutathionylation des composés dérivés de quinones tels que la ménadione. Enfin, à partir d'expériences de compétition entre des substrats aromatiques et une sonde fluorescente spécifique du site actif de ces protéines, nous avons montré que la reconnaissance de substrats glutathionylés par les GSTLs de peuplier est favorisée par rapport à celle des formes non glutathionylées ce qui facilite probablement leur relargage après catalyse enzymatique.

BJ Plant

View this PDF in Utopia Documents for more interactive functionality
Download FREE software now

Biochem. J. (2014) **462**, 39–52 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20140390

online data

Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants

Pierre-Alexandre LALLEMENT*†, Edgar MEUX*†, José M. GUALBERTO‡, Pascalita PROSPER§‖, Claude DIDIERJEAN§‖, Frederick SAUL¶, Ahmed HAOUZ¶, Nicolas ROUHIER*† and Arnaud HECKER*†[1]

*Université de Lorraine, Interactions Arbres–Microorganismes, UMR1136, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
†INRA, Interactions Arbres–Microorganismes, UMR1136, F-54280 Champenoux, France
‡Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS-UPR 2357, 67084 Strasbourg, France
§Université de Lorraine, CRM^2, Equipe BioMod, UMR 7036, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
‖CNRS, CRM^2, Equipe BioMod, UMR 7036, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
¶Institut Pasteur, Département de Biologie Structurale et Chimie, Plate-Forme de Cristallographie, CNRS-UMR3528, 75724 Paris, France

GSTs represent a superfamily of multifunctional proteins which play crucial roles in detoxification processes and secondary metabolism. Instead of promoting the conjugation of glutathione to acceptor molecules as do most GSTs, members of the Lambda class (GSTLs) catalyse deglutathionylation reactions via a catalytic cysteine residue. Three *GSTL* genes (*Pt-GSTL1*, *Pt-GSTL2* and *Pt-GSTL3*) are present in *Populus trichocarpa*, but two transcripts, differing in their 5′ extremities, were identified for *Pt-GSTL3*. Transcripts for these genes were primarily found in flowers, fruits, petioles and buds, but not in leaves and roots, suggesting roles associated with secondary metabolism in these organs. The expression of GFP-fusion proteins in tobacco showed that Pt-GSTL1 is localized in plastids, whereas Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3A and Pt-GSTL3B are found in both the cytoplasm and the nucleus. The resolution of Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3 structures by X-ray crystallography indicated that, although these proteins adopt a canonical GST fold quite similar to that found in dimeric Omega GSTs, their non-plant counterparts, they are strictly monomeric. This might explain some differences in the enzymatic properties of both enzyme types. Finally, from competition experiments between aromatic substrates and a fluorescent probe, we determined that the recognition of glutathionylated substrates is favoured over non-glutathionylated forms.

Key words: catalytic cysteine residue, crystal structure, deglutathionylation, glutathione, Lambda GST, poplar (*Populus trichocarpa*).

INTRODUCTION

GSTs (EC 2.5.1.18) belong to a ubiquitous protein superfamily primarily involved in cellular detoxification and secondary metabolism. These enzymes catalyse the conjugation of glutathione (GSH) to an electrophilic centre contained within a small acceptor molecule such as endogenous and xenobiotic compounds. Many successive GST classifications were proposed on the basis of criteria such as the sequence similarities, the nature of the catalytic residue and the biochemical properties [1,2]. However, with the accumulation of additional sequence data and new biochemical activities, a uniform classification is not available, although an updated list of classes present in all kingdoms was reported recently [3]. In plants, *in silico* analyses of *Populus trichocarpa* (poplar), *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (rice), *Pinus taeda* (loblolly pine), *Hordeum vulgare* (barley), *Selaginella moellendorffii* and *Physcomitrella patens* genomes allowed the identification of 81, 57, 83, 56, 84, 65 and 37 GSTs respectively [4–6]. They are divided into eleven classes: Tau, Phi, Zeta, Theta, EF1Bγ, Ure2p, Haemerythrin, Iota, tetrachlorohydroquinone dehalogenase, Lambda and DHAR (dehydroascorbate reductase). Moreover, an additional class containing orthologues of bacterial and fungal GHRs (glutathionyl hydroquinone reductases) exists in plants [7–9].

Most GSTs are dimers and possess serine or tyrosine as the catalytic residue which probably contributes to the lowering of the pK_a of the cysteine of GSH and thus favour its existence as a thiolate form at physiological pH [10,11]. Other residues interacting with and stabilizing GSH are not well conserved among classes, but also contribute to the catalytic activities [12]. The principal biochemical function attributed to plant

Abbreviations: ANS, 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid; At-GSTL, *Arabidopsis thaliana* GSTL; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; Cys-GST, cysteine-containing GST; DHA, dehydroascorbate; DHAR, dehydroascorbate reductase; GHR, glutathionyl hydroquinone reductase; Grx, glutaredoxin; G-site, glutathione-binding site; GSTFuA, fungus-specific class A GST; GSTL, Lambda GST; GSTO, Omega GST; HED, 2-hydroxyethyl disulfide; Hs-GSTO1, *Homo sapiens* GSTO1; H-site, hydrophobic pocket site; MEN-SG, *S*-glutathionyl-menadione; NO_2FDA, 5-nitrofluorescein diacetate; Os-GSTL, *Oryza sativa* GSTL; PAP, phenylacetophenone; PAP-SG, *S*-glutathionyl-phenylacetophenone; Pc-GSTO, *P. chrysosporium* GSTO; phenethyl-ITC, 2-phenethyl-isothiocyanate; Q-SG, GSH-conjugated quercetin; RT, reverse transcription; Ta-GSTL, *Triticum aestivum* GSTL; TETRA-SG, *S*-glutathionyl-tetralone.

[1] To whom correspondence should be addressed (email arnaud.hecker@univ-lorraine.fr).

Atomic co-ordinates and structure factors have been deposited in the PDB under codes 4PQH and 4PQI for Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3 respectively.

Sequence data from this article can be found at the Phytozome portal using the following locus identifiers: *Potri.008G046800* for *Pt-GSTL1*, *Potri.016G083500* for *Pt-GSTL2* and *Potri.006G133500* for *Pt-GSTL3*.

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

Biochemical Journal www.biochemj.org

GSTs, in particular the serine-containing GST classes, is the capacity to catalyse GSH-conjugation reactions of exogenous and endogenous substrates such as herbicides and secondary metabolites [13–16]. However, some Tau, Phi and Theta GSTs also display peroxidase activities [17–19], whereas Zeta GSTs present isomerase activity towards maleylacetone [20,21]. Moreover, some plant GSTs which bind to hormones such as auxin [15,22] may have ligandin properties as described in mammals [16] and fungi [23].

At the structural level, a prototypical GST folding is usually composed of two domains. The N-terminal domain contains a hydrophilic pocket that binds glutathione (G-site) and a C-terminal domain possessing a hydrophobic pocket (H-site) responsible for substrate binding, both sites forming the active site [1]. The N-terminal domain is relatively conserved among classes and classically adopts a thioredoxin fold [10,11]. In contrast, the C-terminal domain, composed of a variable number of α-helices, is less conserved and therefore generates the necessary variability for accommodating a wide variety of substrates [10,24]. Compared with serine-containing GSTs, GSTLs (Lambda GSTs) and DHAR possess the ancestral catalytic cysteine residue in place of the serine residue which confers different properties on them. Instead of promoting the formation of a reactive thiolate anion at the level of GSH, this catalytic cysteine residue can perform nucleophilic attacks on glutathionylated molecules, leading to the formation of protein–glutathione adducts [25]. Hence, like Grxs (glutaredoxins), Cys-GSTs (cysteine-containing GSTs), which also include Beta (in bacteria) [26], GSTO (Omega GST) (in mammals, fungi and insects) and GHR (in plants, fungi and prokaryotes) classes [27–29], exhibit deglutathionylation activity, but usually no transferase, peroxidase or isomerase activities [25]. However, whereas the physiological function of DHARs is clearly associated to the reduction of DHA (dehydroascorbate), the role of other Cys-GSTs, notably GSTLs, remains largely unknown.

At the genomic level, three genes coding for GSTLs have been identified in *A. thaliana*, *Triticum aestivum* (wheat) [25,30] and *P. trichocarpa* [6], two in *H. vulgare* [5] and one in *P. patens* [4]. Os-GSTL2 (*O. sativa* GSTL2) is up-regulated in roots after herbicide (chlorsulfuron and glyphosate) or hormone (salicylic acid and naphthalene acetic acid) treatments and all Os-GSTLs are differentially expressed in arsenic-sensitive and -tolerant rice genotypes, indicating that they are likely to participate in the oxidative stress response and xenobiotic tolerance [31–33]. Accordingly, *A. thaliana* transgenic lines expressing Os-GSTL2 are more tolerant to abiotic constraints such as heavy metals, cold, drought and salt stresses [34]. From a biochemical point of view, Dixon and Edwards [35] showed that GSTLs from *T. aestivum* and *A. thaliana* exhibit thiol-transferase and eventually DHAR activities, but are unable to catalyse GSH-dependent conjugation reactions. They also determined that flavonoids derived from kaempferol or quercetin bind tightly to Ta-GSTL1 (*T. aestivum* GSTL1) and its *A. thaliana* orthologue (At-GSTL1) and that these enzymes also exhibit *in vitro* deglutathionylation activity towards glutathionylated quercetin [35]. Hence, in addition to their involvement in defence mechanisms towards xenobiotics, GSTLs may also be involved in the glutathione-dependent recycling of oxidized flavonoids.

To better understand the role of GSTLs in plants, a functional analysis of the three *P. trichocarpa* genes was performed by studying their transcript expression pattern in different *P. trichocarpa* organs and the subcellular localization of the corresponding proteins, and by deciphering their enzymatic and structural properties via the production of recombinant proteins.

EXPERIMENTAL

RT (reverse transcription)–PCR experiments

Total RNAs were extracted from 150 mg of eight different tissues of *P. trichocarpa* (stamen, fruit, root, leaf, bud, petiole and male and female flowers) using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) extraction kit following the manufacturer's instructions. For the root, fruit and petiole tissues, Fontainebleau sand and 20 mg·ml^{-1} PEG8000 were added to the extraction buffer and, for root tissues, kit-purified RNAs were purified further by precipitation with 1 M lithium acetate and 70 % ice-cold ethanol for 16 h at −20 °C. For each tissue, genomic DNA was degraded during kit purification by DNase I (RNase-free DNase Set; Qiagen). mRNAs were reverse-transcribed into cDNA from total RNA using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories) following the manufacturer's instructions. PCRs were performed for 25, 30 and 35 cycles by using Go-Taq polymerase (Promega) and specific primer pairs (Supplementary Table S1 at http://www.biochemj.org/bj/462/bj4620039add.htm) designed to amplify a 711, 738, 722 or 723 bp fragment of *Pt-GSTL1*, *Pt-GSTL2*, *Pt-GSTL3A* or *Pt-GSTL3B* cDNA respectively. The *P. trichocarpa* ubiquitin gene (*Potri.015G013600*) was used as the reference gene. The PCR products were analysed by 1 % agarose gel electrophoresis.

Targeting prediction and intracellular localization of GFP-fusion proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves

The presence of putative targeting sequences in Pt-GSTLs was analysed by the prediction software Predotar (http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html), TargetP (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) and WolfPsort (http://wolfpsort.org/).

Full-length GSTL1, GSTL2, GSTL3A and GSTL3B from *P. trichocarpa* were amplified by PCR using fruit cDNAs as template and specific primers (Supplementary Table S1) and further cloned into the pCK-GFP3 vector between NcoI and BamHI [36]. The coding sequence for full-length Pt-GSTL1 was also introduced into pSAT6-EGFP-C1 vector between BglII and BamHI sites [37]. *N. benthamiana* (tobacco) cells were transfected by bombardment and images were obtained with a Zeiss LSM700 confocal microscope. GFP was observed with a 505–550 nm bandpass filter and chloroplasts were visualized by the natural fluorescence of chlorophyll beyond 575 nm after excitation at 488 nm.

Cloning and site-directed mutagenesis

The sequences encoding the mature forms of Pt-GSTL1, Pt-GSTL2, Pt-GSTL3A and Pt-GSTL3B were cloned by PCR in the pET28a (Novagen) vector between the NcoI and NotI restriction sites using primers detailed in Supplementary Table S1. For Pt-GSTL1, the sequence corresponding to the N-terminal plastid-targeting sequence (i.e. the 68 first amino acids) was removed. Mutated sequences in which the active-site cysteine residue is replaced by serine or alanine were generated by using the QuikChange® site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) and specific mutagenic oligonucleotides listed in Supplementary Table S1.

Protein expression and purification

Expression was performed at 37 °C using the transformed *Escherichia coli* Rosetta2(DE3) pLysS strain (Novagen)

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

in LB medium containing kanamycin (50 μg·ml^{-1}) and chloramphenicol (34 μg·ml^{-1}). When the cell culture reached a D_{600} of 0.7, protein expression was induced with 0.1 mM IPTG and cells were grown for a further 4 h. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in a 30 mM Tris/HCl (pH 8.0) and 200 mM NaCl lysis buffer and stored at −20 °C. Cell lysis was completed by sonication (three times for 1 min with intervals of 1 min). The cell extract was then centrifuged at 35 000 ***g*** for 25 min at 4 °C to remove cellular debris and aggregated proteins.

After a differential fractionation with ammonium sulfate (40 and 80 % saturation), the untagged recombinant proteins (wild-type and mutated Pt-GSTL1 and Pt-GSTL2) were purified by size-exclusion chromatography after loading on an Ultrogel® ACA44 (5 cm×75 cm, Biosepra) column equilibrated with 30 mM Tris/HCl (pH 8.0) and 200 mM NaCl buffer. The fractions containing the recombinant protein were then pooled, dialysed by ultrafiltration to remove NaCl, and loaded on to a DEAE-cellulose column (Sigma) in 30 mM Tris/HCl (pH 8.0). The proteins were eluted using a 0–400 mM NaCl gradient. For C-terminal His_6-tagged proteins (wild-type and mutated Pt-GSTL3), 10 mM imidazole was added in the soluble fraction before loading on to an Ni-NTA (Ni^{2+}-nitrilotriacetate)–agarose resin connected to an ÄKTA purifier FPLC system (GE Healthcare). After a washing step with lysis buffer supplemented with 20 mM imidazole, the proteins were eluted using an imidazole gradient from 20 to 500 mM. The fractions of interest were pooled, dialysed, concentrated by ultrafiltration under nitrogen pressure (YM10 membrane; Amicon), and stored in 30 mM Tris/HCl (pH 8.0) and 200 mM NaCl buffer at −20 °C.

The homogeneity of the proteins was checked by SDS/PAGE. Protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm and using theoretical molar absorption coefficients of 34 442.5 M^{-1}·cm^{-1}, 31 462.5 M^{-1}·cm^{-1}, 32 952.5 M^{-1}·cm^{-1} and 32 952.5 M^{-1}·cm^{-1} deduced from the primary sequences of Pt-GSTL1, Pt-GSTL2, Pt-GSTL3A and Pt-GSTL3B respectively.

Table 1 Statistics of X-ray diffraction data collection and model refinement

Values in parentheses are for the highest resolution shell. MR, molecular replacement. R_{all} was determined from all the reflections (working set + test set), whereas R_{free} corresponds to a subset of reflections (test set).

	Pt-GSTL1	Pt-GSTL3
Data collection		
Beamline	BM14, ESRF	PX1, SOLEIL
Space group	$P1$	$P2_12_12_1$
Number of monomers in the asymmetric unit	2	1
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	33.01, 45.83, 66.74	41.52, 77.01, 82.64
α, β, γ (°)	91.5, 102.4, 96.3	
Resolution (Å)	45.5–1.40 (1.48–1.40)	38.51–1.95 (2.06–1.95)
R_{merge}	0.05 (0.59)	0.047 (0.59)
Mean $I/\sigma(I)$	16.3 (2.4)	16.2 (2.2)
Completeness (%)	95.2 (93.1)	98.6 (97.5)
Observations (n)	281755 (71115)	68948 (9715)
Redundancy	4.0 (4.0)	3.5 (3.5)
Wilson B-factor (Å^2)	11.9	35.8
Phasing method	MR	MR
Refinement		
Resolution (Å)	45.50–1.40 (1.46–1.40)	38.51–1.95 (2.05–1.95)
Reflections (n)	71143 (8573)	19544 (2513)
Cutoff	$F>0\sigma(F)$	$F>0\sigma(F)$
R_{all} (%)	14.9	18.3
R_{free} (%)	19.3 (27.1)	22.3 (32.3)
Average B-factor (Å^2)		
Protein atoms	19.3	47.7
Ligand atoms	18.3	40.4
Solvent atoms	30.8	48.9
Ramachandran statistics (%)		
Preferred regions	98.2	98.7
Allowed regions	1.8	1.3
Outlier residues	0.0	0.0
RMSDs		
Bond length (Å)	0.005	0.008
Bond angle (°)	1.02	1.108

Crystallization and structure determination of recombinant Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3

Initial screening of crystallization conditions was carried out by the vapour diffusion method with a Mosquito™ nanolitre-dispensing system (TTP Labtech). Sitting drops were set up using 400 nl of a 1:1 mixture of Pt-GSTL proteins and crystallization solutions (672 different commercially available conditions) equilibrated against 150 μl of reservoir solution in multiwell plates (Greiner Bio-One). The crystallization plates were stored at 18 °C in a RockImager1000™ (Formulatrix) automated imaging system to monitor crystal growth. Manual optimization was performed in Limbro plates using the hanging-drop method. For Pt-GSTL3, the best crystals were obtained by mixing 1.5 μl of untreated purified protein at 20 mg·ml^{-1} with 1.5 μl of reservoir solution of 25 % (w/v) PEG4000, 200 mM calcium chloride and 100 mM Tris/HCl (pH 8.5). Crystals of Pt-GSTL1 were obtained by mixing 2 μl of untreated purified protein at 33 mg·ml^{-1} with 2 μl of reservoir solution containing 30 % (w/v) PEG4000, 200 mM ammonium acetate and 100 mM sodium acetate (pH 4.6).

Single crystals of GSTL1 and GSTL3 were flash-cooled in liquid nitrogen using a mixture of 50 % Paratone-N and 50 % paraffin oil as cryoprotectant. X-ray diffraction data for Pt-GSTL1 were collected on beamline BM14 at synchrotron ESRF (Grenoble, France), and for Pt-GSTL3 on beamline PROXIMA-1 at synchrotron SOLEIL (St. Aubin, France). The diffraction images were integrated with the program XDS [38] and crystallographic calculations were carried out with programs from the CCP4 program suite [39].

The structure of Pt-GSTL1 was solved by the molecular replacement method with the program MolRep [40] using a monomer of human GSTO2 as template (PDB code 3QAG). The Pt-GSTL3 structure was solved by molecular replacement with Phaser software [41] using PDB code 3QAG as template. Two independent protein molecules were identified in the crystallographic asymmetric unit for Pt-GSTL1 and a single molecule for Pt-GSTL3.

The structures were refined by alternate cycles of restrained maximum-likelihood refinement with the program Phenix [42] and manual adjustments were made to the models with Coot [43]. The crystal parameters, data statistics and final refinement parameters are shown in Table 1. All structural Figures were generated with PyMOL (http://www.pymol.org).

Substrate preparation

PAP-SG (*S*-glutathionyl-phenylacetophenone), MEN-SG (*S*-glutathionyl-menadione) and TETRA-SG (*S*-glutathionyl-tetralone) were prepared as described previously [44–46]. Q-SG (GSH-conjugated quercetin) was prepared at room temperature by incubating quercetin at a concentration of 143 μM to a solution containing 50 mM phosphate buffer (pH 8.0), 2 mM

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

GSH and 16 units·ml^{-1} tyrosinase from mushroom (Sigma) under stirring. This step was repeated seven times. After a final 18 min incubation, reaction products were separated on a Strata™-X column (Phenomenex) using methanol as eluent to remove residual quercetin. Then, eluted products were loaded on to a Semi-prep Gemini 5μ C_{18} 110A column (10 mm×250 mm; Phenomenex) equilibrated with water containing 2 % formic acid. Q-SG was eluted (3 ml·min^{-1}) using a linear gradient from 0 to 30 % acetonitrile over 18 min, followed by 2 min of isocratic elution with 30 % acetonitrile, and a further 10 min linear gradient from 30 to 100 % acetonitrile. Separation was monitored at 335 and 370 nm to discriminate between Q-SG and quercetin respectively. Purified product was concentrated, dissolved in water and finally analysed by MS.

Enzymatic activities

Thiol-transferase, DHAR and peroxidase activities have been assayed on HED (2-hydroxyethyl disulfide), DHA and various peroxides (H_2O_2, t-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide) by using an NADPH-coupled spectrophotometric method. Glutathionylation activity has been tested towards CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene), phenethyl-ITC (2-phenethyl-isothiocyanate) and PNP butyrate (*p*-nitrophenyl butyrate) by monitoring the absorbance at 340, 274 or 412 nm respectively. More detail on these classic assays is provided in the Supplementary Online Data at http://www.biochemj.org/bj/462/bj4620039add.htm.

Deglutathionylation activity of GSTLs towards PAP-SG, MEN-SG and TETRA-SG was measured at 25 °C in 650 μl of a 30 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA buffer containing 4 mM GSH and PAP-SG (5.6 to 1538 μM) or MEN-SG (1 mM) or TETRA-SG (1 mM). Reactions were started by the addition of recombinant enzymes and stopped by the addition of 350 μl of ethanol and vigorous mixing for 20 s for Pt-GSTL2 or 30 s for Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3. After centrifugation at 14000 ***g*** for 15 min, reaction products were analysed by HPLC using a Gemini 5μ C_{18} 110A column (3 mm×150 mm) equilibrated with water containing 30 mM acetic acid (pH 4.16) and 10 % (v/v) acetonitrile. Products were eluted (1 ml·min^{-1}) over 5 min using a linear gradient from 10 to 50 % acetonitrile. PAP (phenylacetophenone)/PAP-SG, menadione/MEN-SG and tetralone/TETRA-SG were detected at 293, 250 and 254 nm respectively. The amount of formed products was calculated by calibration curves and the kinetic parameters determined. Deglutathionylation of Q-SG was assayed in 500 μl of 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) containing 2 mM GSH and 0.64 to 10.69 μM Q-SG. After 1 min of incubation at 25 °C, the reaction was started by the addition of recombinant enzymes and the increase of absorbance at 380 nm recorded, assessing quercetin formation.

Esterase activity was measured towards CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) and NO_2FDA (5-nitrofluorescein diacetate) by measuring specific fluorescence emission of the substrates after cleavage by Pt-GSTLs at 25 °C. The reaction was carried out in 200 μl of 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) in the presence or absence of 2 mM GSH for NO_2FDA or CMFDA assays respectively, 500 nM of reduced recombinant proteins and 0.5–75 μM or 0.5–500 μM of CMFDA or NO_2FDA respectively. Excitation was performed at 485 nm and fluorescence emission was recorded at 535 nm every 2 min for 30 min on a Victor™ X5 plate reader (PerkinElmer). To determine steady-state kinetic parameters, the fluorescence from the reaction products was compared with the fluorescence emitted by 1 μM substrate previously cleaved by an excess of GSTLs.

For all activity assays, three independent experiments were performed at each substrate concentration. The k_{cat} and apparent K_m values were calculated using a Michaelis–Menten non-linear regression model with GraphPad Prism 5 software. The k_{cat} values are expressed as μmol of substrate oxidized per min per μmol of enzyme (i.e. the turnover number, min^{-1}), using specific molar absorption coefficients of 6220 M^{-1}·cm^{-1} at 340 nm for NADPH, 9600 M^{-1}·cm^{-1} at 340 nm for CDNB, 8890 M^{-1}·cm^{-1} at 274 nm for phenethyl-ITC, and 17400 M^{-1}·cm^{-1} at 380 nm for quercetin [35].

ANS (8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid) binding

ANS-binding competition experiments were performed at 25 °C in 30 mM Tris/HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA buffer by using a Cary Eclipse (Varian) fluorescence spectrophotometer. ANS binding on to recombinant proteins was followed by monitoring fluorescence emission upon the addition of 50 μM ANS to 3 μM protein. The excitation wavelength was set at 385 nm, and the emission spectra were recorded from 400 to 700 nm. The correlation between ANS concentration and fluorescence level was obtained by incubating 50 or 100 μM recombinant Pt-GSTL1 or Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 respectively and 1 μM ANS, giving the maximal value for 1 μM ANS bound to the protein. Fluorescence of ANS alone was subtracted as a background. Recombinant proteins (3 μM) were then incubated with increasing concentrations of ANS (0–1 mM). Dissociation constants (K_d) of ANS were determined by three independent assays using eqn (1):

$$Y = B_{max} \times \frac{[\text{free ANS}]}{K_d + [\text{free ANS}]} \quad (1)$$

where Y represents the concentration of ANS bound per protein and B_{max} is the number of maximum specific binding sites present on the protein.

Assessment of ligand binding by competition assays using ANS

The competition experiments were performed at 25 °C in 200 μl of 30 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 500 nM cysteine-to-serine mutants in the presence of 0.125–100 μM quercetin or Q-SG and either 25 μM ANS when using Pt-GSTL1 C36S or 50 μM ANS for Pt-GSTL2 C40S and Pt-GSTL3 C41S. Excitation was set at 385 nm and fluorescence emission at 460 nm was recorded using a Victor™ X5 plate reader for 30 min immediately after the addition of a mixture of ANS and ligand. Concentration values which inhibit 50 % of ANS–protein binding (IC_{50}) were obtained by fitting data to eqn (2):

$$Y = \text{bottom} + \frac{\text{top} - \text{bottom}}{1 + 10^{\log[\text{ligand}] - \log IC_{50}}} \quad (2)$$

where Y represents the fluorescence signal observed after background subtraction, top is the fluorescence signal of ANS bound on to the studied protein without any ligand, and bottom is the fluorescence signal of ANS at the highest ligand concentration. Inhibition constants (K_i) were calculated from experimentally determined IC_{50} values using the webserver tool IC_{50}-to-K_i calculator (http://botdb.abcc.ncifcrf.gov/toxin/kiConverter.jsp). K_i values were calculated by selecting Protein–Ligand–Inhibitor system, competitive inhibition model and tight inhibition equations [47].

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

Substrates and probes

All chemical structures of substrates and probes used in the present study are shown in Supplementary Figure S1 (http://www.biochemj.org/bj/462/bj4620039add.htm).

RESULTS

Phylogenetic and sequence analyses of *P. trichocarpa* GSTLs

In silico analysis of the various versions of the *P. trichocarpa* genome recurrently led to the identification of three genes (*Pt-GSTL1*, *Pt-GSTL2* and *Pt-GSTL3*) coding for GSTLs as defined previously [6]. However, when comparing these three *P. trichocarpa* gene/protein sequences with the sequences reported previously [6], we have systematically observed differences in the 5′ end of the coding sequences for all Pt-GSTLs and in the 3′ end of the coding sequences for Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3. More precisely, Pt-GSTL1 was longer by approximately 90 amino acids and Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 were longer by approximately 30 amino acids in their N-terminal region. These differences are consistent with the presence of ESTs. The nature of the additional 60 amino acids in Pt-GSTL1 suggests the presence of an N-terminal targeting sequence. For *Pt-GSTL3*, two transcripts differing in the 5′ end were identified. Cloning experiments from *P. trichocarpa* cDNAs using primers that hybridize in the 5′ UTR confirmed the existence of both transcripts. The N-terminal region of the resulting proteins (Pt-GSTL3A and Pt-GSTL3B) starts with the sequence MATASALDK or MGSLDK respectively. In terms of sequence similarity, the percentage identity of Pt-GSTL1 (devoid of its N-terminal targeting sequence) is 68 % with Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3, which have an identity of 89 %, suggesting that Pt-GSTL1 probably diverged earlier than Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 which originate from a more recent duplication.

We performed an exhaustive search of GSTL homologues in the available eukaryotic genomes. The GSTL genes are only present in Viridiplantae, including *P. patens*, as one to three copies, but not in green algae and *S. moellendorffii*. All of these GSTLs exhibit the typical CP[Y/F]A active-site signature which resembles previously recognized CP[Y/F][C/S], CP[W/F][A/T], CP[F/Y][V/A], [S/C]PY[C/A] and CPF[C/S] motifs found in Grxs, GHRs (formerly GSTO subclass I), GSTO subclass II, GSTO subclass III and DHARs respectively [48]. It is also very similar to the CPYC and CP[Y/F]T sequences found in the newly identified Iota GSTs and Haemerythrin GST-fusion proteins [4].

Subcellular localization and transcript expression in *P. trichocarpa* organs

The presence of three genes and at least four different transcripts in *P. trichocarpa* and of one to three genes in other sequenced vascular plants raises the question of the function(s) of the corresponding enzymes and their potential redundancy or specificity. Sequence analyses predicted a chloroplastic localization for Pt-GSTL1 and cytoplasmic localizations for Pt-GSTL2 and both Pt-GSTL3A and Pt-GSTL3B. To confirm these assumptions, full-length Pt-GSTLs fused at the N-terminal of GFP were expressed in *N. benthamiana* leaves. According to the predictions, Pt-GSTL2, Pt-GSTL3A and Pt-GSTL3B were localized in the cytoplasm, but also in the nucleus (Figure 1). Whether these nuclear localizations are physiologically relevant or due to passive diffusion from the cytoplasm (the molecular mass of the fusion proteins is approximately 55 kDa) remains to be examined further. Concerning Pt-GSTL1, the fluorescence associated with the construct co-localized with the natural chlorophyll fluorescence, indicating that the N-terminal extension indeed corresponds to a chloroplast-targeting sequence (Figure 1). Accordingly, removal of the putative targeting sequence resulted in a cytoplasmic and nuclear localization (Supplementary Figure S2A at http://www.biochemj.org/bj/462/bj4620039add.htm). Interestingly, Pt-GSTL1 possesses a C-terminal AHL motif very similar to the ARL motif present in At-GSTL2 which was found to be dual-targeted to the chloroplasts and peroxisomes [49]. However, a Pt-GSTL1 version lacking the N-terminal 68 amino acids and fused at the C-terminus of the GFP sequence, thereby exposing the AHL motif, displayed only a nucleocytoplasmic localization (Supplementary Figure S2B).

In order to investigate the expression pattern of these genes, RT–PCR experiments were carried out on different tissues of a naturally growing pure *P. trichocarpa* cultivar. To analyse gene expression in the linear range of PCR amplification, experiments were performed with 25, 30 or 35 amplification cycles. The best detection was obtained after 30 cycles (Figure 2). Pt-GSTL1 transcripts are primarily found in female flowers, fruits and petioles, although a weak expression was visible in almost all other organs tested after 35 PCR cycles. *Pt-GSTL2* and *Pt-GSTL3A* genes are expressed in all tissues analysed, but the transcripts are more abundant in female flowers, fruits and petioles as well as in buds for Pt-GSTL2. For Pt-GSTL3B, a very low expression was detected only after 35 PCR cycles in specific tissues, i.e. male flowers, fruits and petioles.

A glutathione is bound to the catalytic cysteine residue of recombinant Pt-GSTLs

To investigate their biochemical and structural properties, the mature forms of Pt-GSTL1, Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3A, as well as single mutated protein variants (where the catalytic cysteine residue was replaced by serine or alanine), were expressed in *E. coli*. Given the small difference between Pt-GSTL3A and Pt-GSTL3B, biochemical analyses were performed only with Pt-GSTL3A. After purification, the oligomeric state of wild-type and mutated proteins was estimated by calibrated exclusion chromatography. All purified proteins were eluted as a single peak whose estimated molecular mass is consistent with the theoretical molecular mass of the monomer, indicating that they are monomeric in solution (Supplementary Table S2 at http://www.biochemj.org/bj/462/bj4620039add.htm). To confirm these results, wild-type proteins and cysteine-to-serine mutants were analysed by MS. A Q-TOF (quadrupole TOF) analysis of DTT-reduced Pt-GSTL1, Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 revealed single species with molecular masses of 26 699, 27 230 and 28 189 Da respectively, which are compatible with proteins where the N-terminal methionine is cleaved (Supplementary Table S2). In the absence of reducing treatment, two species were systematically detected for purified wild-type GSTLs, one corresponding to reduced proteins and one with a mass increment of 305 Da likely to correspond to a glutathione moiety. The latter was not observed in variants mutated at the active-site cysteine residue, suggesting that the glutathione is covalently bound to the active-site cysteine residue via a disulfide bridge.

Overall structure of Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3

The crystal structures of recombinant Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3 were solved to a resolution of 1.40 and 1.95 Å (1 Å = 0.1 nm) respectively (Table 1). Pt-GSTL1 crystallized in the space group

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

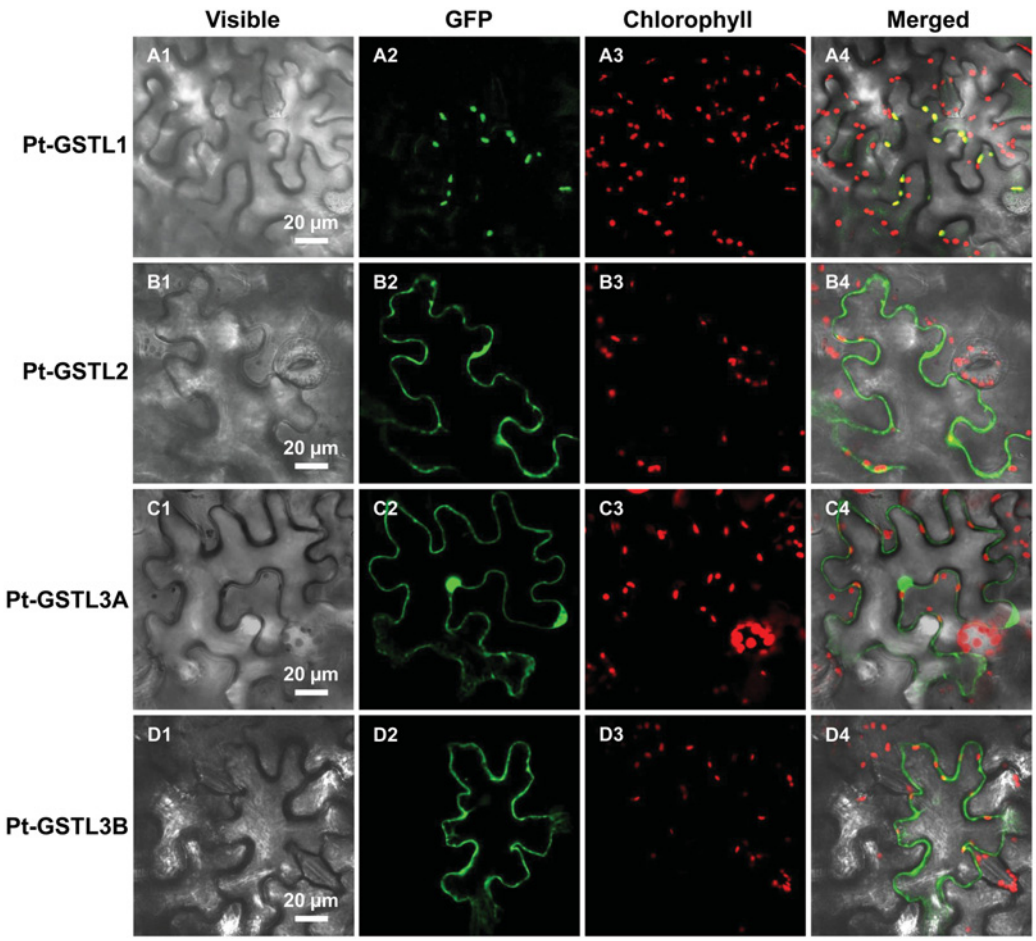


Figure 1 Subcellular localization of Pt-GSTL1, Pt-GSTL2, Pt-GSTL3A and Pt-GSTL3B by GFP fusions

The pCK-GFP3 constructs in which the sequences coding for full-length Pt-GSTLs were fused in-frame at the 5′ end of a GFP-coding sequence were used to bombard young *N. benthamiana* leaves. GFP was observed with a 505–550 nm bandpass filter and chloroplasts were visualized by the natural fluorescence of chlorophyll beyond 575 nm after excitation at 488 nm. The images correspond to epidermal cells. From left to right: 1, visible light; 2, fluorescence of the construct (green); 3, autofluorescence of chlorophyll (red); and 4, merged images.

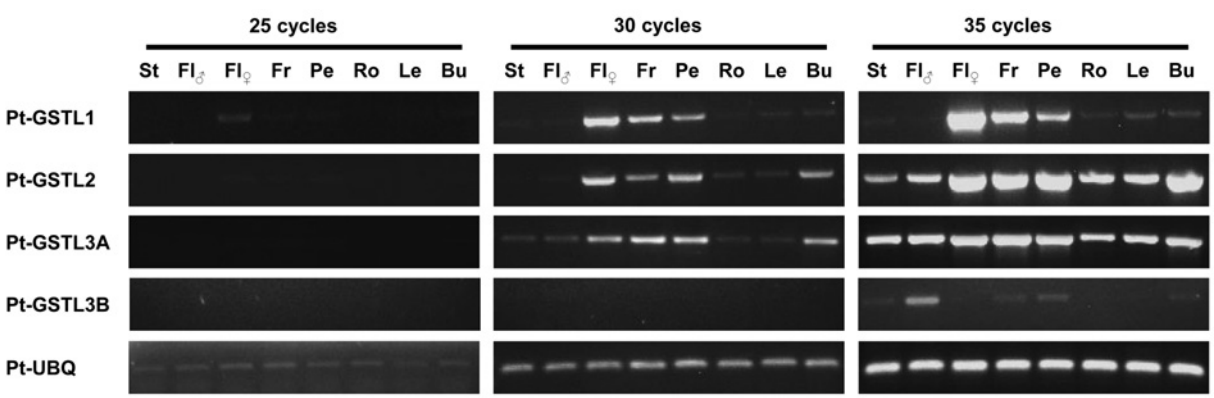


Figure 2 RT–PCR analysis of the mRNA expressions of *Pt-GSTL* genes in various *P. trichocarpa* tissues

Transcript expression patterns in stamens (St), male (Fl♂) and female (Fl♀) flowers, fruits (Fr), petioles (Pe), roots (Ro), leaves (Le) and buds (Bu) have been analysed after 25, 30 or 35 PCR cycles. The ubiquitin gene (Pt-UBQ) was the constitutively expressed gene used as a reference.

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

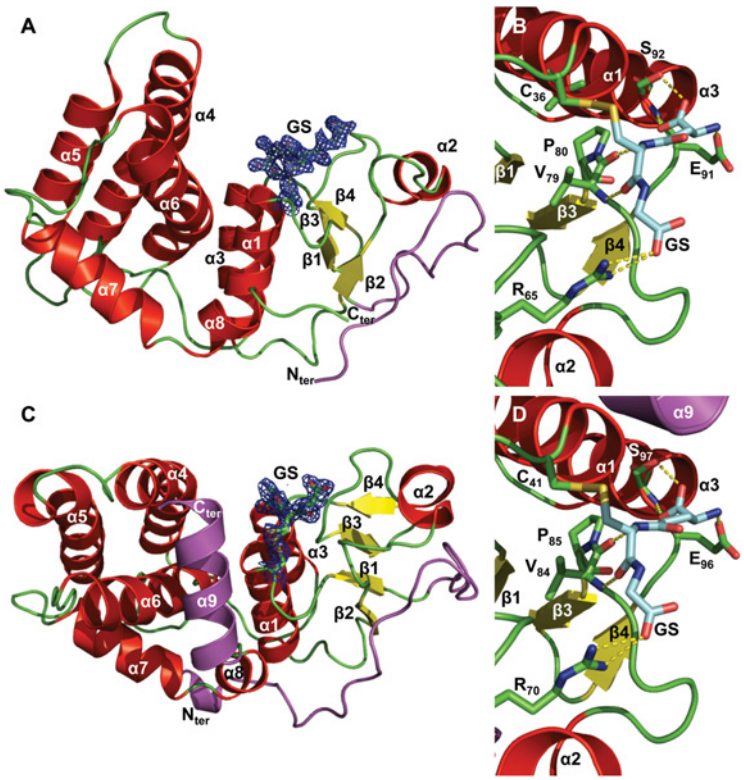


Figure 3 Structures of Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3 in complex with glutathione

Representation of the overall fold of Pt-GSTL1 (**A**) and Pt-GSTL3 (**C**). β-Strands are shown in yellow, α-helices are in red, and connecting loops are in green. The N-terminal and C-terminal extensions are highlighted in magenta. The covalently-bound glutathione (GS) and the catalytic cysteine residue are shown as sticks. The final omit electron-density map (1.2σ) is shown covering the covalently bound glutathione molecule. Glutathione-binding sites of Pt-GSTL1 (**B**) and Pt-GSTL3 (**D**). The catalytic cysteine residues (Cys^{36} or Cys^{41}) which form an intermolecular disulfide bond with glutathione are shown as sticks. The Figures also highlight the polar non-covalent interactions between the enzymes and glutathione. The putative polar interactions are shown as broken yellow lines. Residues involved in these interactions and glutathione are labelled and shown as sticks. The secondary structures are labelled.

P_1 with two independent monomers in the asymmetric unit. Clear electron density was seen for Glu^8–Pro^{221} in monomer A and Glu^8–Glu^{140} and Glu^{143}–Pro^{221} in monomer B. The two monomers could be superimposed with an RMSD of 0.29 Å for 180 superimposed Cα atoms. Pt-GSTL3 crystallized in space group $P2_12_12_1$, with a single monomer in asymmetric unit (Thr^3–Leu^{240}). Quaternary structure analysis using the program PISA [50] suggested that Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3 are monomeric, in accordance with our gel-filtration experiments (Supplementary Table S2) and with previous observations made for At-GSTL1 and At-GSTL2 [25]. Except for a few differences described below, the structures of Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3 are very similar, with an RMSD of 0.57 Å for 171 superimposed Cα atoms. A glutathione moiety was revealed unambiguously in electron-density maps of both structures, but the sulfur atom of glutathione was refined over two positions near the sulfur atom of the active-site cysteine residue, with distances of 2.05 and 3.0 Å. This probably indicates that these intermolecular disulfide bonds were partially broken during the X-ray exposure of the crystals.

Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3 display the canonical GST fold which consists of a thioredoxin N-terminal domain ($\beta1\alpha1\beta2\alpha2\beta3\beta4\alpha3$) and an α-helical C-terminal domain ($\alpha4\alpha5\alpha6\alpha7\alpha8\alpha9$ in Pt-GSTL3) (Figures 3A and 3C). In Pt-GSTL1, the last 15 residues (including helix $\alpha9$) were not visible in the electron-density maps probably because of disorder in this region. Compared with most GSTs, GSTL members have an N-terminal extension which is analogous to that of GSTOs [51] (Supplementary Figure S3 at http://www.biochemj.org/bj/462/bj4620039add.htm). A search for structural homologues using the DALI web server [52] revealed that the closest neighbours belong to the GSTO class. A structural comparison of Pt-GSTL3 and Hs-GSTO1 (*Homo sapiens* GSTO1) showed three significant differences located in the C-terminal domain: the C-terminal and N-terminal ends respectively of $\alpha4$ and $\alpha5$ and the connection $\alpha4$–$\alpha5$, the C-terminal end of $\alpha6$ and the connection $\alpha6$–$\alpha7$, and the C-terminal tail following $\alpha8$ (Supplementary Figure S4 at http://www.biochemj.org/bj/462/bj4620039add.htm). These differences do not appear to be class-dependent because analogous differences can be observed between different isoforms and even between monomers in the same crystal structure. For example, the C-terminal region following helix $\alpha8$ exhibits two distinct conformations in two polymorphs of Hs-GSTO1 [53] and in two independent monomers of the crystal structure of GSTO3 from the silkworm *Bombyx mori* [54]. This C-terminal part displays an α-helix ($\alpha9$) in Pt-GSTL3 which is disordered in the structure of Pt-GSTL1. This region could be involved in substrate recognition since residues from $\alpha9$ were assumed to contribute to the H-site in Hs-GSTO1 [51,53]. The most striking structural difference between GSTLs and GSTOs is the oligomerization state (monomeric and dimeric respectively) [51]. Most non-polar residues which are buried in the dimer interface in Hs-GSTO1 are replaced by polar residues in Pt-GSTL1 and

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

Pt-GSTL3 (Supplementary Figure S3), with these residues being well conserved in the respective classes. Thus, although GSTLs and GSTOs exhibit a similar topology, specific differences in amino acid residues present at the protein surface influence their oligomeric state.

In both structures, a glutathione molecule is covalently bound to the catalytic cysteine residue (Cys^{36} in Pt-GSTL1 and Cys^{41} in Pt-GSTL3). The non-covalent anchoring motif of GSH is quite similar to that of most known GSTs: (i) in the loop $\beta4$–$\alpha3$, Glu^{91} and Ser^{92} (Pt-GSTL1 numbering) residues stabilize the charged group of GluGS (glutamate residue of glutathione); (ii) in the loop $\beta3$–$\beta4$, Val^{79} (Pt-GSTL1 numbering) in hydrogen-bonded to the backbone of CysGS (cysteine residue of glutathione); and (iii) in the loop $\beta2$–$\alpha2$, the side chain of Arg^{65} (Pt-GSTL1 numbering) makes a salt bridge to the carboxy group of GlyGS (glycine residue of glutathione) (Figures 3B and 3D, and Supplementary Figure S3). In mammalian GSTOs, a conserved lysine residue (Lys^{59} in Hs-GSTO1) performs the same function as Arg^{65}, but the latter interaction is not present in some GSTs.

In the absence of bound substrate, it is difficult to identify precisely the H-site residues in Pt-GSTL structures. However, a relatively polar deep pocket, which could be the H-site, is observed in the vicinity of the catalytic cysteine residue [51]. This hydrophobic pocket includes Phe^{31} and Pro^{33} which flank the catalytic cysteine residue, Arg^{183} from $\alpha6$ and Trp^{222} from $\alpha9$ (Hs-GSTO1 numbering). In the Pt-GSTL3 structure, a similar H-site can be defined with polar and non-polar residues mainly contained in the loop $\beta1$–$\alpha1$ and helices $\alpha4$, $\alpha6$ and $\alpha9$ (Figure 4B). This pocket appears to be more accessible in the Pt-GSTL1 structure since the C-terminal region containing helix $\alpha9$ was not visible in the electron-density maps (Figure 4A).

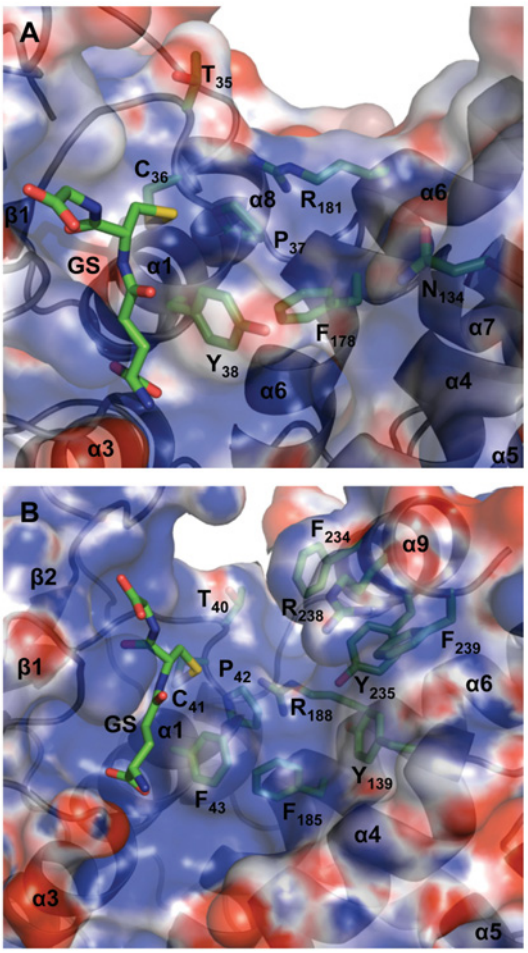


Figure 4 Structure of putative H-site in Pt-GSTL1 (A) and Pt-GSTL3 (B)

In Pt-GSTL3, a cleft visible in the vicinity of the G-site could accommodate the non-glutathione moiety of the substrate. This region appears more solvent-accessible in Pt-GSTL1 because the C-terminal region ($\alpha9$ in Pt-GSTL3) is flexible in the crystal structure. The residues forming these pockets are shown as sticks and are labelled. The secondary structures are labelled. GS, glutathione covalently (glutathione adduct) bound to the catalytic cysteine residue of the enzyme.

Pt-GSTL enzymatic activities

All recombinant Pt-GSTLs are active on both HED and DHA, two substrates commonly used to characterize the reductase/deglutathionylation activity of Grxs. The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for HED is higher by factors of 2, 10 and 18 for Pt-GSTL1, Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 respectively, compared with that measured for DHA (Table 2). Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 have comparable k_{cat}/K_m values for both substrates, whereas Pt-GSTL1 exhibited a stronger activity with DHA, but a weaker activity with HED. Concerning DHA, the measured differences essentially arise from a higher turnover number (k_{cat}) for Pt-GSTL1. Concerning HED, the lower catalytic efficiency of Pt-GSTL1 results from a weaker affinity, the apparent K_m being 5- and 10-fold higher than for Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 respectively. As expected, these activities are related to the presence of the catalytic cysteine residue, since Pt-GSTL1 C36S, Pt-GSTL2 C40S and Pt-GSTL3 C41S variants are inactive. Unlike the wild-type proteins, weak glutathionylation activity was detected for these variants using CDNB and phenethyl-ITC, indicating that they acquired GSH-conjugating activities typical of serine-containing GSTs (Table 2). Accordingly, this glutathionylation activity is completely abolished when the catalytic cysteine residues are mutated to alanine.

We investigated the ability of recombinant Pt-GSTLs to catalyse the deglutathionylation of MEN-SG, TETRA-SG and PAP-SG, three substrates used for the characterization of several human and fungal GSTOs and fungal GHRs [8,46,55], whose structures are close to GSTLs. After synthesis and purification of each substrate, Pt-GSTL activities were monitored by analytical HPLC in the presence of GSH. The results indicated that Pt-GSTLs are only able to deglutathionylate PAP-SG, the catalytic efficiencies obtained with Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 being similar (5.9×10^3 $mM^{-1}\cdot min^{-1}$ and 5.4×10^3 $mM^{-1}\cdot min^{-1}$ respectively) and higher than Pt-GSTL1 (1.6×10^3 $mM^{-1}\cdot min^{-1}$) (Table 2). The capacity of recombinant Pt-GSTLs to reduce Q-SG was also tested, as Ta-GSTLs and At-GSTLs were shown to perform this reaction [35]. All Pt-GSTLs were able to deglutathionylate Q-SG, but with a weak turnover number (from 1.56 to 22.91 min^{-1}) (Table 2). Nevertheless, these enzymes present a significant catalytic efficiency (from 0.73×10^3 to 9.58×10^3 $mM^{-1}\cdot min^{-1}$) due to their high apparent affinity for the substrate (apparent K_m ranging from 2.13 to 4.16 μM). As expected, all variants with a mutated catalytic cysteine residue were inactive with both PAP-SG and Q-SG. Single turnover experiments were performed by incubating reduced proteins with an excess of either PAP-SG or Q-SG in the absence of GSH. Concomitant with the release of the reaction product (PAP or quercetin) detected by analytical HPLC, an increase of 305 Da was observed by MS, confirming that glutathionylation of the catalytic cysteine residue occurs as an intermediate of the reaction cycle (results not shown).

To test the possibility that Pt-GSTLs have esterase activity, as observed for human and fungal GSTOs [46,56] and for GSTFuAs (fungus-specific class A GSTs) [23,57], we used two fluorescent substrates, CMFDA and NO_2FDA. Both molecules have two

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

Table 2 Kinetic parameters of Pt-GSTL1, Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3

The apparent K_m values for all compounds were determined for Pt-GSTL1, Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 by varying substrate concentrations at a fixed saturating GSH concentration. The apparent K_m and k_{cat} values were calculated by non-linear regression using the Michaelis–Menten equation. Results are means ± S.D. ($n = 3$). Asterisks (*) represent very low activity which was not measurable; nd, not detected. The detection limit was estimated at 0.5 m-IU for spectrophotometric tests, whereas 0.5 nmol of either quercetin or phenylacetophenone was detected using analytical HPLC.

(a) k_{cat} (min^{-1})

Enzyme	HED	DHA	CDNB	Phenethyl-ITC	PAP-SG	Q-SG	CMFDA	NO_2FDA
Pt-GSTL1	400.80 ± 9.78	89.82 ± 1.66	nd	nd	451.70 ± 31.51	22.91 ± 1.25	0.087 ± 0.003	0.49 ± 0.01
Pt-GSTL1 C36S	nd	*	*	7.05 ± 0.93	nd	nd	nd	nd
Pt-GSTL2	181.90 ± 4.61	36.96 ± 1.24	nd	nd	991.50 ± 34.75	3.96 ± 0.32	0.024 ± 0.0007	0.052 ± 0.001
Pt-GSTL2 C40S	*	nd	29.41 ± 3.85	112.30 ± 12.74	nd	nd	nd	nd
Pt-GSTL3	106.00 ± 1.41	19.36 ± 0.57	nd	nd	190.80 ± 6.73	1.56 ± 0.08	0.026 ± 0.02	0.19 ± 0.004
Pt-GSTL3 C41S	nd	nd	11.10 ± 0.77	355.60 ± 51.47	nd	nd	nd	nd

(b) K_m (mM for HED, DHA, CDNB, phenethyl-ITC and PAP-SG; μM for Q-SG, CMFDA and NO_2FDA)

Enzyme	HED	DHA	CDNB	Phenethyl-ITC	PAP-SG	Q-SG	CMFDA	NO_2FDA
Pt-GSTL1	0.20 ± 0.02	0.09 ± 0.01	nd	nd	0.28 ± 0.05	2.39 ± 0.39	1.25 ± 0.13	55.18 ± 4.11
Pt-GSTL1 C36S	nd	*	*	0.53 ± 0.10	nd	nd	nd	nd
Pt-GSTL2	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.01	nd	nd	0.17 ± 0.02	4.16 ± 0.74	4.42 ± 0.3	10.26 ± 0.64
Pt-GSTL2 C40S	*	nd	1.35 ± 0.32	0.30 ± 0.06	nd	nd	nd	nd
Pt-GSTL3	0.02 ± 0.00	0.08 ± 0.01	nd	nd	0.04 ± 0.01	2.13 ± 0.33	1.44 ± 0.31	21.23 ± 1.35
Pt-GSTL3 C41S	nd	nd	1.78 ± 0.21	0.79 ± 0.14	nd	nd	nd	nd

(c) k_{cat}/K_m ($mM^{-1}\cdot min^{-1}$)

Enzyme	HED	DHA	CDNB	Phenethyl-ITC	PAP-SG	Q-SG	CMFDA	NO_2FDA
Pt-GSTL1	2078.00 ± 50.72	1028.00 ± 18.98	nd	nd	1598.00 ± 111.50	9579.00 ± 524.30	70.20 ± 2.14	8.84 ± 0.25
Pt-GSTL1 C36S	nd	*	*	13.30 ± 1.75	nd	nd	nd	nd
Pt-GSTL2	4774.00 ± 120.90	465.90 ± 15.60	nd	nd	5888.00 ± 188.40	951.80 ± 77.63	5.34 ± 0.15	5.02 ± 0.12
Pt-GSTL2 C40S	*	nd	26.69 ± 3.49	371.90 ± 42.17	nd	nd	nd	nd
Pt-GSTL3	4370.00 ± 58.14	245.40 ± 7.22	nd	nd	5443.00 ± 192.10	732.90 ± 38.16	18.20 ± 1.11	8.85 ± 0.20
Pt-GSTL3 C41S	nd	nd	6.25 ± 0.43	451.30 ± 65.31	nd	nd	nd	nd

ester bonds, but the reactive chloromethyl group of CMFDA is replaced by an NO_2 group in the NO_2FDA derivative. The cleavage of these ester bonds is accompanied by the appearance of a fluorescence emission at 535 nm after excitation at 485 nm [58]. Compared with GSTO3, GSTO4 and GSTFuA1 of *Phanerochaete chrysosporium*, Pt-GSTLs exhibit a low esterase activity, with turnover numbers ranging from 0.024 to 0.087 min^{-1} and from 0.052 to 0.49 min^{-1} for CMFDA and NO_2FDA respectively (Table 2). However, the catalytic efficiencies are similar because of a higher apparent affinity (K_m values range from 1.25 to 4.42 μM for CMFDA and from 10.26 to 55.18 μM for NO_2FDA) (Table 2). It is worth noting that only reduced proteins have esterase activity; cysteine-to-serine mutants and glutathionylated Pt-GSTLs are inactive against these substrates, indicating that this activity requires the nucleophilic properties of the catalytic cysteine residue. Although this esterase activity is unlikely to be physiologically relevant, our results suggest that CFMDA might constitute an interesting probe for competition studies to test the binding of glutathionylated substrates.

Is there a preference for the binding of glutathionylated substrates?

To address this point, competition experiments were performed between glutathionylated or non-glutathionylated quercetin (Q-SG/quercetin) and a fluorescent probe (ANS) known to bind to the active site of GSTFuAs [23,57]. ANS is a non-fluorescent probe that becomes fluorescent in hydrophobic environments [59] and that has been used as a competitive probe for screening potential GSTFuA substrates. As a prerequisite, we investigated the ability of Pt-GSTLs to bind ANS specifically in the H-site. ANS binding to reduced and substrate-free Pt-GSTLs is associated with the appearance of a characteristic fluorescence peak with a maximum at 475 nm. The fluorescence signal upon interaction of Pt-GSTL1, Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 with ANS is established in less than 10 s, and increasing the molar ratio of ANS to Pt-GSTLs results in a saturation curve that can be exploited to determine a dissociation constant (K_d) of 23.28 ± 1.76 μM for Pt-GSTL1 (Figure 5A), 61.20 ± 3.49 μM for Pt-GSTL2 (Supplementary Figure S5A at http://www.biochemj.org/bj/462/bj4620039add.htm) and 27.77 ± 2.37 μM for Pt-GSTL3 (Supplementary Figure S6A at http://www.biochemj.org/bj/462/bj4620039add.htm). As described previously for *P. chrysosporium* GSTFuA [23], a decrease in the fluorescence intensity with ANS concentration was observed above 100 μM for Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3, and 250 μM for Pt-GSTL2. From these titration curves, the deduced number of bound ANS was 1.05 ± 0.04 for Pt-GSTL1 (Figure 5A), 1.03 ± 0.03 μM for Pt-GSTL2 (Supplementary Figure S5A) and 0.86 ± 0.02 μM for Pt-GSTL3 (Supplementary Figure S6A), indicating that Pt-GSTLs have a single ANS-binding site. Similar results were obtained with cysteine-to-serine variants (not shown). In order to confirm that ANS binds to the H-site, molecules known to bind to the G- (GSH, CMFDA or NO_2FDA) or H- (quercetin or PAP) sites were used as competitors. As shown in Figure 5(B) and Supplementary Figures S5(B) and S6(B), the binding of ANS is only affected by adding quercetin or PAP (with or without glutathionyl adduct). These results reveal that ANS indeed binds specifically to the H-site of Pt-GSTLs and can be competitively removed.

Having obtained the confirmation that ANS is a suitable probe, competition experiments were performed by incubating inactive cysteine-mutated variants with ANS in the presence of various concentrations of glutathionylated or non-glutathionylated quercetin and PAP (G-SG/quercetin, PAP-SG/PAP). Thus

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

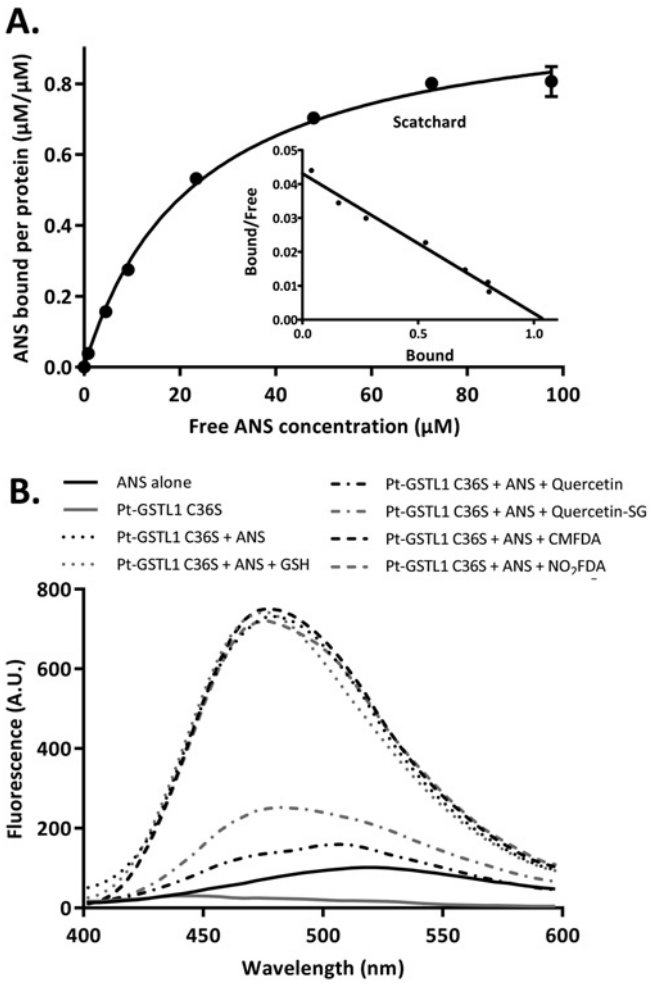


Figure 5 ANS binding to Pt-GSTL1 C36S

(**A**) Binding saturation curve of Pt-GSTL1 C36S with ANS and corresponding Scatchard plot (inset). (**B**) Fluorescence spectra (excitation at 385 nm) of 50 μM ANS bound to 3 μM Pt-GSTL1 C36S in presence of 10 mM GSH and 30 μM quercetin, 3 μM quercetin-SG, 30 μM CMFDA or 30 μM NO_2FDA. The emission spectrum of 50 μM ANS alone is also shown as a control. A.U., arbitrary unit(s).

diminution of the emitted fluorescence for each substrate concentration was first used to determine the concentration of inhibitor that inhibits 50 % of the binding (IC_{50}). However, inhibition constants (K_i) were preferred over IC_{50} values because the latter depends on enzyme, inhibitor or substrate concentrations. All Pt-GSTLs exhibit quite similar K_i values using quercetin (from 5 to 6 μM) or PAP (from 8 to 52 μM). A significant difference was observed for all Pt-GSTLs by comparing quercetin and quercetin-SG or PAP and PAP-SG. The only notable exception was Pt-GSTL3, which exhibits similar K_i values for quercetin and its conjugated version. The K_i values obtained for Pt-GSTL1 and Pt-GSTL2 are 11- and 6-fold higher respectively with quercetin than with quercetin-SG, and those obtained for Pt-GSTL1, Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 are 6-, 16- and 6-fold higher with PAP than with PAP-SG (Table 3). These results indicate that glutathionylated forms of quercetin or PAP are preferentially recognized over non-glutathionylated forms. This may not be surprising considering that GSTLs have deglutathionylation activity. The similar binding of quercetin and quercetin-SG to PtGSTL3 may simply reflect the fact that quercetin-SG is not a physiological substrate of this enzyme or that other factors are important for substrate binding and release.

Table 3 Competition experiments between ANS and glutathionylated or non-glutathionylated quercetin and PAP (Q-SG/quercetin, PAP-SG/PAP)

Inhibition constants (K_i) (in μM) were calculated from experimentally determined IC_{50} values.

Enzyme	PAP	PAP-SG	Quercetin	Q-SG
Pt-GSTL1 C36S	26.74 ± 0.15	4.55 ± 0.34	5.11 ± 0.38	0.45 ± 0.03
Pt-GSTL2 C40S	8.67 ± 0.21	0.54 ± 0.07	6.19 ± 0.34	1.01 ± 0.02
Pt-GSTL3 C41S	52.62 ± 1.59	8.48 ± 0.73	5.07 ± 0.24	6.03 ± 0.80

DISCUSSION

Although the physiological role of GSTLs is still uncertain, it has been reported that cereal and *A. thaliana* GSTLs are involved in stress responses induced by chemical treatments and environmental constraints, and in binding of several flavonoids possibly participating in the maintenance of their pools [30]. At the biochemical level, only Ta-GSTL and At-GSTL have been characterized. Hence, since the production of recombinant proteins was unsuccessful in the previous large-scale analysis of *P. trichocarpa* GSTs [6], a thorough structure–function analysis of the three GSTLs present in this model tree was performed.

GSTLs: Cys-GSTs specifically present in terrestrial plants

Among the Cys-GST classes found in photosynthetic organisms, only GHRs are present in all photosynthetic organisms analysed (cyanobacteria, green algae and terrestrial plants). Indeed, Haemerythrin and Iota GST classes are restricted to the moss *P. patens* and the club moss *S. moellendorffii*. DHARs are present in algae and terrestrial plants and GSTLs are present only in terrestrial plants. Considering this distribution, it would have been tempting to propose that GSTLs derive from GHRs, but the fact that the supposed prokaryotic Grx2 ancestor, DHARs and GSTLs are monomeric proteins, whereas other Cys-GSTs (bacterial and fungal GHRs and mammalian GSTOs) and GSTs having serine or tyrosine as the catalytic residue are dimeric suggests that GSTLs diverged very early in the evolution of this protein family. However, although current analyses indicate that GSTLs represent an innovation specifically found in terrestrial plants, too much information is lacking at this stage to precisely establish their evolutionary origin.

Focusing on the evolution and distribution of GSTLs, the presence of a single gene in *P. patens*, two to three genes in angiosperms and up to five genes in a gymnosperm, *P. taeda* [4], but its absence from *S. moellendorffii* indicates that several duplication events occurred in vascular plants from the ancestral GSTL gene found in *P. patens* and that GSTL has been specifically lost in *S. moellendorffii*. From the sequence analysis and phylogenetic proximity, *Pt-GSTL1* is the closest orthologue of *P. patens GSTL1* and probably derives from the ancestral version. Accordingly both proteins and the *Arabidopsis* orthologue, At-GSTL2, possess an N-terminal extension corresponding to a plastid-targeting sequence [4]. However, At-GSTL2 was also found in peroxisomes upon GFP-fusion overexpression experiments [49]. Although Pt-GSTL1 possesses a C-terminal AHL motif quite similar to the ARL motif found in At-GSTL2, no dual-targeting was observed. In terms of transcripts, Pt-GSTL1 transcripts are mainly present in female flowers, fruits and petioles, but surprisingly not, or at very low levels, in leaves, suggesting that Pt-GSTL1 may also be present in other plastids

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

as chromoplasts, since these organelles are particularly abundant in reproductive organs in contrast with chloroplasts.

Concerning Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3, we hypothesize that they appeared later. The simplest explanation is that a first duplication event occurred from GSTL1 giving rise to a GSTL2/GSTL3 ancestor which has lost the sequence coding for the chloroplast-targeting signal. Since all angiosperms and gymnosperms analysed have at least two *GSTLs*, this duplication was shared by most terrestrial plants and may be quite ancient. Finally, a more recent duplication event probably resulted in the formation of the *GSTL2* and *GSTL3* genes in *P. trichocarpa* or in one of its ancestor species. This is in accordance with the observation of 90 % amino acid sequence identity between the three gene products (Pt-GSTL2, Pt-GSTL3A and Pt-GSTL3B) identified from these two genes and with their similar nucleocytoplasmic localization. Hence the question of the redundancy between these three versions is clearly raised. In fact, the transcript expression patterns of Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3A are quite comparable. Although detectable levels can be found in all tissues examined, both genes are primarily expressed in female flowers, fruits, petioles and buds. This is also comparable with the Pt-GSTL1 expression pattern which mainly differs by its absence of expression in buds. Pt-GSTL3B is generally weakly expressed, being found almost exclusively in male flowers. Hence the importance of this Pt-GSTL3B spliced variant outside male flowers may be questioned. Overall, whereas Pt-GSTL1 is unique, neither the transcript expression patterns nor the subcellular localization allowed differentiating Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3A. Interestingly, the expression territories of GSTLs in *P. trichocarpa* seem to be linked to specific organs with an active secondary metabolism, i.e. flowers, fruits and buds to a lesser extent. This may not be surprising considering that the majority of the ligands found to be associated with GSTLs so far are flavonoids and that these coloured organs are rich in polyphenolic pigments [35]. Strikingly, although a previous expression study performed from 2-month-old cuttings of *P. trichocarpa* indicated that all three genes were expressed in leaf, shoot, bud, phloem and root tissues [6], the *GSTL* expression in roots and leaves harvested from a naturally growing tree was weak. According to the general inducible nature of GSTs, Pt-GSTLs could well be induced in these organs during a specific developmental stage or in response to specific stress conditions.

Comparison of the enzymatic and structural properties of GSTLs with other Cys-GSTs

In order to examine further their reactivity and to identify possible differences among Pt-GSTLs, we have performed enzymatic and structural studies of the recombinant proteins. Although the sequences of Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 are highly homologous and both proteins were expressed and purified to homogeneity, no crystals were obtained for Pt-GSTL2. The structures of Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3 revealed that both proteins adopt the canonical GST fold. As GHRs and GSTOs, GSTLs have an unusually long N-terminal extension [8,51]. A comparison with other GST structures clearly revealed that the GSTL monomer is quite similar to a GSTO monomer, although some variability was observed in three regions of the C-terminal domain. This variability could be important considering that two of these three regions could influence substrate recognition by contributing to the topology of the H-site cleft. Another important structural difference concerns the quaternary arrangement since GSTLs are monomeric and GHRs and GSTOs are both dimeric but adopt two distinct dimerization modes.

According to the presence of a conserved cysteine residue in the active-site motif, it was initially shown using *T. aestivum* and *Arabidopsis* isoforms that GSTLs were able to reduce glutathione adducts formed on HED using a glutathione-regenerating system. Surprisingly, with the exception of Ta-GSTL1, all proteins tested (Ta-GSTL2, Ta-GSTL3, At-GSTL1 and At-GSTL2), were not or were very poorly efficient in the reduction of DHA [25,35]. In contrast, all Pt-GSTLs are quite efficient, exhibiting catalytic efficiencies for DHA ranging from 10^3 to 10^4 $M^{-1}\cdot s^{-1}$, which are similar to those obtained with Grxs [60], but still far from those reported for DHARs, 10^8 $M^{-1}\cdot s^{-1}$ for a *Populus tomentosa* DHAR [61], suggesting that DHA is unlikely to be a physiological substrate of GSTLs. Unlike some Cys-GSTs such as Hs-GSTO1, Hs-GSTO2 [62] or a Beta GST from *Proteus mirabilis* (Pm-GST) [63], most plant GSTLs, including Pt-GSTLs, are unable to reduce peroxides and to catalyse GSH-conjugation reactions [4].

As mentioned above, most of the molecules identified so far that could constitute physiological substrates were flavonoids derived from kaempferol or quercetin [35]. These GSTLs exhibited deglutathionylation activity towards Q-SG and they distinguished two diastereoisomeric C-ring conjugates of Q-SG, Q-SG1 and Q-SG2, showing that Ta-GSTL1, but not Ta-GSTL2 and Ta-GSTL3, exhibited a preference for one diastereoisomer. Owing to the fact that glutathionylated quercetin is unstable and is spontaneously broken down to a reactive and toxic benzofuranone species, the authors proposed that GSTLs could participate in flavonoid metabolism, thereby preventing the formation of potentially toxic intermediates by reducing glutathionylated flavonoids [30]. Pt-GSTLs also exhibit deglutathionylation activity towards Q-SG with turnover numbers (1.5–23 min^{-1}) lower by a factor of 5–10 compared with those obtained with Ta-GSTLs and At-GSTLs (globally around 100–140 min^{-1}) [35].

Among other substrates used to characterize fungal GSTOs and GHRs [8,46], Pt-GSTLs are only able to deglutathionylate PAP-SG, but not TETRA-SG and MEN-SG. The catalytic efficiencies obtained with Pt-GSTLs (from 1 to 6×10^3 $mM^{-1}\cdot min^{-1}$) are comparable with Pc-GSTO3 (*P. chrysosporium* GSTO3) (2.4×10^3 $mM^{-1}\cdot min^{-1}$), but weaker compared with Pc-GSTO4 (5.2×10^4 $mM^{-1}\cdot min^{-1}$). The catalytic efficiency is also higher than that observed for Hs-GSTO1 (7.8×10^2 $mM^{-1}\cdot min^{-1}$) with acetophenone-SG, a derivative slightly different from PAP-SG. The fact that GSTLs exhibit activity with a GSTO substrate (PAP-SG), but not with a GHR substrate (MEN-SG), supports the observation that the structure of GSTLs is more similar to that of GSTOs. Hence a certain substrate specificity is visible among GST classes, but is not class-related. Consistent with the phylogenetic analysis, Pt-GSTL1 almost systematically exhibited catalytic properties different from Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3, which were generally in the same range. For example, catalytic efficiencies of Pt-GSTL1 with DHA, Q-SG and CMFDA were higher than for Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3, but lower with the HED and PAP-SG reduction tests.

Concerning the reaction mechanism, single turnover experiments (i.e. by incubating reduced enzyme with glutathionylated substrate in the absence of reduced glutathione preventing the regeneration of the enzyme after the first catalytic cycle) indicated that the reduced enzyme has bound a glutathionylated substrate, the catalytic cysteine residue performs a nucleophilic attack and then the deglutathionylated product is released concomitantly with the formation of a glutathione adduct on the active-site cysteine residue. The release of the product from the enzyme active site is likely to be facilitated by a change in the affinity for glutathionylated compared with non-glutathionylated substrates as observed notably for Pt-GSTL1 and Pt-GSTL2 with quercetin and PAP. With the same idea

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

of understanding the sequence of events and conformational changes occurring in the active site, Dixon and Edwards [35] observed with Ta-GSTL1 that the deglutathionylated product is better recognized by a glutathionylated enzyme than by a reduced enzyme. This may suggest that the release of the product could be more efficient when the G-site is free, i.e. when the glutathionylated cysteine residue is reduced. Despite the presence of an additional cysteine residue, three residues upstream from the catalytic cysteine residue, in Pt-GSTL2 and Pt-GSTL3 and its close proximity in the 3D structure, there is no evidence that the formation of a disulfide bridge could be an intermediate in the regeneration mechanism. Indeed, an important proportion of recombinant *P. trichocarpa* and *Arabidopsis* proteins is purified with a glutathione adduct and a Ta-GSTL1 C38S variant mutated at the corresponding cysteine residue has an activity comparable with that of the wild-type enzyme [35]. Hence the recycling of glutathionylated GSTLs is likely to occur via the nucleophilic attack of an additional GSH moiety on the glutathione adduct present on the catalytic cysteine residue, forming oxidized glutathione. According to their common evolutionary origin, the catalytic mechanism of GSTLs is similar to the one described for Grxs and other Cys-GSTs (Hs-GSTOs, and fungal and bacterial GHRs).

Towards the identification of physiological substrates

Besides their role in the removal of xenobiotics as herbicides, GSTs are often associated with secondary metabolism. Initial case studies showed that Phi and Tau GSTs can bind pigments such as anthocyanins or hormones such as auxins or their modified derivatives [16,64]. With the aim of identifying physiological substrates, *in vitro* or *in vivo* 'ligand fishing' strategies were established by immobilizing a recombinant protein serving as an affinity matrix or by expressing a tagged protein *in cellulo* [30]. Using these systems, it was determined that some Tau GSTs bind porphyrin intermediates and fatty acids present in bacterial or plant extracts [15,65] and, as discussed above, that GSTLs bind flavonoids [35]. However, a quercetin-3-*O*-rhamnoside also binds to the GSH-conjugating Phi GSTs [66]. The next question is to determine whether the binding of these molecules is simply and uniquely for transport/ligandin functions or whether it is associated with a catalytic reaction, either glutathionylation or deglutathionylation. Only rare examples exist about the functionally relevant contribution of GST to a metabolic or biosynthetic pathway. It has been demonstrated that glutathione conjugates constitute intermediary compounds involved in the synthesis of sulfur-containing defence molecules such as camalexins or glucosinolates [67,68]. For example, *Arabidopsis* GSTF6 participates in camalexin synthesis by catalysing the conjugation of GSH to indole-3-acetonitrile [67]. Also, camalexin was found to bind to GSTF2 [66], which might suggest that GSTFs could have either catalytic or transport functions at different steps of camalexin biosynthesis. However, GSTLs would not *a priori* contribute to this pathway, since no deglutathionylation reaction is needed in this case. Indeed, the sulfur atom is finally integrated in the molecule and the glutathione conjugates are degraded into cysteine conjugates by γ-glutamyl peptidases [68].

Looking to an alternative strategy for identifying GSTL substrates, we have shown that Pt-GSTLs exhibit esterase activity towards CMFDA and NO_2FDA, molecules that specifically bind to the G-site of Pt-GSTLs, but also of GSTOs [46,56]. Importantly, the binding of glutathione or of glutathionylated substrates prevents CMFDA cleavage. On the other hand, we have shown that Pt-GSTLs also bind to one ANS molecule specifically at the H-site, which can be removed by competition with known substrates, as shown for human and fungal GSTOs [46,69] and fungal GSTFuAs [23]. In conclusion, these fluorescent probes represent a good alternative for identifying new GSTL substrates from various sources such as crude extracts, mixtures of extracted secondary metabolites or chemical libraries. Indeed, the identification of specific substrates will undoubtedly be a major challenge in the coming years to better understand the cellular functions of GSTs.

AUTHOR CONTRIBUTION

Pierre-Alexandre Lallement, José Gualberto, Claude Didierjean, Ahmed Haouz, Nicolas Rouhier and Arnaud Hecker conceived and designed the experiments. Pierre-Alexandre Lallement, Edgar Meux, José Gualberto, Ahmed Haouz, Nicolas Rouhier and Arnaud Hecker performed the experiments. Pierre-Alexandre Lallement, Pascalita Prosper, Claude Didierjean, Frederick Saul, Ahmed Haouz, Nicolas Rouhier and Arnaud Hecker analysed the data. Pierre-Alexandre Lallement, Claude Didierjean, Frederick Saul, Ahmed Haouz, Nicolas Rouhier and Arnaud Hecker wrote the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge SOLEIL and ESRF for provision of synchrotron radiation facilities and would like to thank the staff of beamlines PROXIMA-1 and BM14 for assistance.

FUNDING

This work was supported by a grant overseen by Agence Nationale de la Recherche as part of the 'Investissements d'Avenir' programme [grant number ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE].

REFERENCES

1 Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. and Dowd, C. A. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem. J. **360**, 1–16 CrossRef PubMed
2 Frova, C. (2006) Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. Biomol. Eng. **23**, 149–169 CrossRef PubMed
3 Jacquot, J. P., Dietz, K. J., Rouhier, N., Meux, E., Lallement, P. A., Selles, B. and Hecker, A. (2013) Redox regulation in plants: glutathione and "redoxin" related families. In Oxidative Stress and Redox Regulation (Jakob, U. and Reichmann, D., eds), pp. 213–231, Springer, Dordrecht CrossRef
4 Liu, Y. J., Han, X. M., Ren, L. L., Yang, H. L. and Zeng, Q. Y. (2013) Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants. Plant Physiol. **161**, 773–786 CrossRef PubMed
5 Rezaei, M. K., Shobbar, Z. S., Shahbazi, M., Abedini, R. and Zare, S. (2013) Glutathione S-transferase (GST) family in barley: Identification of members, enzyme activity, and gene expression pattern. J. Plant Physiol. **170**, 1277–1284 CrossRef PubMed
6 Lan, T., Yang, Z. L., Yang, X., Liu, Y. J., Wang, X. R. and Zeng, Q. Y. (2009) Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family. Plant Cell **21**, 3749–3766 CrossRef PubMed
7 Belchik, S. M. and Xun, L. (2011) S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a new class of glutathione transferases functioning as oxidoreductases. Drug Metab. Rev. **43**, 307–316 CrossRef PubMed
8 Meux, E., Prosper, P., Ngadin, A., Didierjean, C., Morel, M., Dumarcay, S., Lamant, T., Jacquot, J. P., Favier, F. and Gelhaye, E. (2011) Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class. J. Biol. Chem. **286**, 9162–9173 CrossRef PubMed
9 Lam, L. K., Zhang, Z., Board, P. G. and Xun, L. (2012) Reduction of benzoquinones to hydroquinones via spontaneous reaction with glutathione and enzymatic reaction by S-glutathionyl-hydroquinone reductases. Biochemistry **51**, 5014–5021 CrossRef PubMed
10 Dirr, H., Reinemer, P. and Huber, R. (1994) Refined crystal structure of porcine class Pi glutathione S-transferase (pGST P1–1) at 2.1 Å resolution. J. Mol. Biol. **243**, 72–92 CrossRef PubMed

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

11 Armstrong, R. N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. Chem. Res. Toxicol. **10**, 2–18 CrossRef PubMed
12 Atkinson, H. J. and Babbitt, P. C. (2009) Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. Biochemistry **48**, 11108–11116 CrossRef PubMed
13 DeRidder, B. P., Dixon, D. P., Beussman, D. J., Edwards, R. and Goldsbrough, P. B. (2002) Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners. Plant Physiol. **130**, 1497–1505 CrossRef PubMed
14 Harms, H., Schlosser, D. and Wick, L. Y. (2011) Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Nat. Rev. Microbiol. **9**, 177–192 CrossRef PubMed
15 Dixon, D. P., Lapthorn, A., Madesis, P., Mudd, E. A., Day, A. and Edwards, R. (2008) Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases. J. Biol. Chem. **283**, 20268–20276 CrossRef PubMed
16 Smith, A. P., Nourizadeh, S. D., Peer, W. A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A. S. and Goldsbrough, P. B. (2003) *Arabidopsis* AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. Plant J. **36**, 433–442 CrossRef PubMed
17 Roxas, V. P., Smith, Jr, R. K., Allen, E. R. and Allen, R. D. (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. Nat. Biotechnol. **15**, 988–991 CrossRef PubMed
18 Cummins, I., Wortley, D. J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C. R., Straker, H. E., Sellars, J. D., Knight, K., Edwards, L., Hughes, D. et al. (2013) Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **110**, 5812–5817 CrossRef PubMed
19 Marrs, K. A. (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **47**, 127–158 CrossRef PubMed
20 Fernandez-Canon, J. M., Baetscher, M. W., Finegold, M., Burlingame, T., Gibson, K. M. and Grompe, M. (2002) Maleylacetoacetate isomerase (MAAI/GSTZ)-deficient mice reveal a glutathione-dependent nonenzymatic bypass in tyrosine catabolism. Mol. Cell. Biol. **22**, 4943–4951 CrossRef PubMed
21 Thom, R., Dixon, D. P., Edwards, R., Cole, D. J. and Lapthorn, A. J. (2001) The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. J. Mol. Biol. **308**, 949–962 CrossRef PubMed
22 Bilang, J. and Sturm, A. (1995) Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. Plant Physiol. **109**, 253–260 CrossRef PubMed
23 Mathieu, Y., Prosper, P., Buee, M., Dumarcay, S., Favier, F., Gelhaye, E., Gerardin, P., Harvengt, L., Jacquot, J. P., Lamant, T. et al. (2012) Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. J. Biol. Chem. **287**, 39001–39011 CrossRef PubMed
24 Wilce, M. C. and Parker, M. W. (1994) Structure and function of glutathione S-transferases. Biochim. Biophys. Acta **1205**, 1–18 CrossRef PubMed
25 Dixon, D. P., Davis, B. G. and Edwards, R. (2002) Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants: identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. **277**, 30859–30869 CrossRef PubMed
26 Caccuri, A. M., Antonini, G., Allocati, N., Di Ilio, C., De Maria, F., Innocenti, F., Parker, M. W., Masulli, M., Lo Bello, M., Turella, P. et al. (2002) GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*: a snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme. J. Biol. Chem. **277**, 18777–18784 CrossRef PubMed
27 Whitbread, A. K., Masoumi, A., Tetlow, N., Schmuck, E., Coggan, M. and Board, P. G. (2005) Characterization of the Omega class of glutathione transferases. Methods Enzymol. **401**, 78–99 CrossRef PubMed
28 Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., Jacquot, J. P. and Gelhaye, E. (2013) Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. Microb. Biotechnol. **6**, 248–263 CrossRef PubMed
29 Allocati, N., Federici, L., Masulli, M. and Di Ilio, C. (2012) Distribution of glutathione transferases in Gram-positive bacteria and archaea. Biochimie **94**, 588–596 CrossRef PubMed
30 Dixon, D. P., Steel, P. G. and Edwards, R. (2011) Roles for glutathione transferases in antioxidant recycling. Plant Signal. Behav. **6**, 1223–1227 CrossRef PubMed
31 Hu, T., He, S., Yang, G., Zeng, H., Wang, G., Chen, Z. and Huang, X. (2011) Isolation and characterization of a rice glutathione S-transferase gene promoter regulated by herbicides and hormones. Plant Cell Rep. **30**, 539–549 CrossRef PubMed
32 Hu, T., Qv, X., Xiao, G. and Huang, X. (2009) Enhanced tolerance to herbicide of rice plants by over-expression of a glutathione S-transferase. Mol. Breed. **24**, 409–418 CrossRef
33 Kumar, S., Asif, M., Chakrabarty, D., Tripathi, R., Dubey, R. and Trivedi, P. (2013) Differential expression of rice Lambda class GST gene family members during plant growth, development, and in response to stress conditions. Plant Mol. Biol. Report. **31**, 569–580 CrossRef
34 Kumar, S., Asif, M. H., Chakrabarty, D., Tripathi, R. D., Dubey, R. S. and Trivedi, P. K. (2013) Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, OsGSTL2, in *Arabidopsis* provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses. J. Hazard. Mater. **248–249**, 228–237 CrossRef
35 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 CrossRef PubMed
36 Menand, B., Marechal-Drouard, L., Sakamoto, W., Dietrich, A. and Wintz, H. (1998) A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**, 11014–11019 CrossRef PubMed
37 Tzfira, T., Tian, G. W., Lacroix, B., Vyas, S., Li, J., Leitner-Dagan, Y., Krichevsky, A., Taylor, T., Vainstein, A. and Citovsky, V. (2005) pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. Plant Mol. Biol. **57**, 503–516 CrossRef PubMed
38 Kabsch, W. (2010) Xds. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **66**, 125–132 CrossRef PubMed
39 Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A. et al. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **67**, 235–242 CrossRef PubMed
40 Vagin, A. and Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOLREP. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **66**, 22–25 CrossRef PubMed
41 McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. J. Appl. Crystallogr. **40**, 658–674 CrossRef PubMed
42 Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W. et al. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **66**, 213–221 CrossRef PubMed
43 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **66**, 486–501 CrossRef PubMed
44 Nickerson, W. J., Falcone, G. and Strauss, G. (1963) Studies on quinone-thioethers. I. Mechanism of formation and properties of thiodione. Biochemistry **2**, 537–543 CrossRef PubMed
45 Vince, R., Daluge, S. and Wadd, W. B. (1971) Studies on the inhibition of glyoxalase I by S-substituted glutathiones. J. Med. Chem. **14**, 402–404 CrossRef PubMed
46 Meux, E., Morel, M., Lamant, T., Gerardin, P., Jacquot, J. P., Dumarcay, S. and Gelhaye, E. (2013) New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases. Biochimie **95**, 336–346 CrossRef PubMed
47 Cer, R. Z., Mudunuri, U., Stephens, R. and Lebeda, F. J. (2009) IC_{50}-to-K_i: a web-based tool for converting IC_{50} to K_i values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. Nucleic Acids Res. **37**, W441–W445 CrossRef PubMed
48 Daiyasu, H., Watanabe, K. and Toh, H. (2008) Recruitment of thioredoxin-like domains into prostaglandin synthases. Biochem. Biophys. Res. Commun. **369**, 281–286 CrossRef PubMed
49 Dixon, D. P., Hawkins, T., Hussey, P. J. and Edwards, R. (2009) Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. J. Exp. Bot. **60**, 1207–1218 CrossRef PubMed
50 Krissinel, E. and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. J. Mol. Biol. **372**, 774–797 CrossRef PubMed
51 Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L. S., Schulte, G. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V. et al. (2000) Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. J. Biol. Chem. **275**, 24798–24806 CrossRef PubMed
52 Holm, L. and Rosenstrom, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. Nucleic Acids Res. **38**, W545–W549 CrossRef PubMed
53 Zhou, H., Brock, J., Casarotto, M. G., Oakley, A. J. and Board, P. G. (2011) Novel folding and stability defects cause a deficiency of human glutathione transferase Omega 1. J. Biol. Chem. **286**, 4271–4279 CrossRef PubMed
54 Chen, B. Y., Ma, X. X., Guo, P. C., Tan, X., Li, W. F., Yang, J. P., Zhang, N. N., Chen, Y., Xia, Q. and Zhou, C. Z. (2011) Structure-guided activity restoration of the silkworm glutathione transferase Omega GSTO3-3. J. Mol. Biol. **412**, 204–211 CrossRef PubMed
55 Board, P. G. and Anders, M. W. (2007) Glutathione transferase Omega 1 catalyzes the reduction of S-(phenacyl)glutathiones to acetophenones. Chem. Res. Toxicol. **20**, 149–154 CrossRef PubMed
56 Son, J., Lee, J. J., Lee, J. S., Schuller, A. and Chang, Y. T. (2010) Isozyme-specific fluorescent inhibitor of glutathione S-transferase Omega 1. ACS Chem. Biol. **5**, 449–453 CrossRef PubMed
57 Mathieu, Y., Prosper, P., Favier, F., Harvengt, L., Didierjean, C., Jacquot, J. P., Morel-Rouhier, M. and Gelhaye, E. (2013) Diversification of fungal specific class a glutathione transferases in saprotrophic fungi. PLoS ONE **8**, e80298 CrossRef PubMed

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

58 Zhang, J., Shibata, A., Ito, M., Shuto, S., Ito, Y., Mannervik, B., Abe, H. and Morgenstern, R. (2011) Synthesis and characterization of a series of highly fluorogenic substrates for glutathione transferases, a general strategy. J. Am. Chem. Soc. **133**, 14109–14119 CrossRef PubMed
59 Stryer, L. (1965) The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin: a fluorescent probe of non-polar binding sites. J. Mol. Biol. **13**, 482–495 CrossRef PubMed
60 Couturier, J., Jacquot, J. P. and Rouhier, N. (2013) Toward a refined classification of class I dithiol glutaredoxins from poplar: biochemical basis for the definition of two subclasses. Front. Plant Sci. **4**, 518 PubMed
61 Tang, Z. X. and Yang, H. L. (2013) Functional divergence and catalytic properties of dehydroascorbate reductase family proteins from *Populus tomentosa*. Mol. Biol. Rep. **40**, 5105–5114 CrossRef PubMed
62 Xun, L., Belchik, S. M., Xun, R., Huang, Y., Zhou, H., Sanchez, E., Kang, C. and Board, P. G. (2010) S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases. Biochem. J. **428**, 419–427 CrossRef PubMed
63 Federici, L., Masulli, M., Di Ilio, C. and Allocati, N. (2010) Characterization of the hydrophobic substrate-binding site of the bacterial Beta class glutathione transferase from *Proteus mirabilis*. Protein Eng. Des. Sel. **23**, 743–750 CrossRef PubMed
64 Kitamura, S., Shikazono, N. and Tanaka, A. (2004) TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. Plant J. **37**, 104–114 CrossRef PubMed
65 Dixon, D. P. and Edwards, R. (2009) Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. J. Biol. Chem. **284**, 21249–21256 CrossRef PubMed
66 Dixon, D. P., Sellars, J. D. and Edwards, R. (2011) The *Arabidopsis* Phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. Biochem. J. **438**, 63–70 CrossRef PubMed
67 Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., Feng, J., Liu, G. and Ren, D. (2011) Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell **23**, 364–380 CrossRef PubMed
68 Geu-Flores, F., Moldrup, M. E., Bottcher, C., Olsen, C. E., Scheel, D. and Halkier, B. A. (2011) Cytosolic γ-glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in *Arabidopsis*. Plant Cell **23**, 2456–2469 CrossRef PubMed
69 Weerapana, E., Wang, C., Simon, G. M., Richter, F., Khare, S., Dillon, M. B., Bachovchin, D. A., Mowen, K., Baker, D. and Cravatt, B. F. (2010) Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. Nature **468**, 790–795 CrossRef PubMed

Received 27 March 2014/13 May 2014; accepted 14 May 2014
Published as BJ Immediate Publication 14 May 2014, doi:10.1042/BJ20140390

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

Biochem. J. (2014) **461**, 39–52 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20140390

SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants

Pierre-Alexandre LALLEMENT*†, Edgar MEUX*†, José M. GUALBERTO‡, Pascalita PROSPER§‖, Claude DIDIERJEAN§‖, Frederick SAUL¶, Ahmed HAOUZ¶, Nicolas ROUHIER*† and Arnaud HECKER*†[1]

*Université de Lorraine, Interactions Arbres–Microorganismes, UMR1136, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
†INRA, Interactions Arbres–Microorganismes, UMR1136, F-54280 Champenoux, France
‡Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS-UPR 2357, 67084 Strasbourg, France
§Université de Lorraine, CRM^2, Equipe BioMod, UMR 7036, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
‖CNRS, CRM^2, Equipe BioMod, UMR 7036, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
¶Institut Pasteur, Département de Biologie Structurale et Chimie, Plate-Forme de Cristallographie, CNRS-UMR3528, 75724 Paris, France

DETERMINATION OF THE OLIGOMERIZATION STATE

The oligomerization state of purified GSTLs was analysed by size-exclusion chromatography on Superdex S200 10/300 columns equilibrated in 30 mM Tris/HCl (pH 8.0) and 200 mM NaCl and connected to an ÄKTA purifier system using 100 μg of protein. The flow rate was fixed at 0.5 ml·min^{-1} and detection was recorded at 214 and 280 nm. The columns were calibrated by using molecular-mass standards (Sigma).

REDUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS

Recombinant proteins were incubated with a 10-fold excess of DTT for 1 h at room temperature. Removal of DTT was performed on G25 desalting columns, and fractions of interest were pooled and concentrated on Amicon ultracentrifugal filters (Millipore).

ENZYMATIC ACTIVITIES

Thiol-transferase, DHAR and peroxidase activities have been assayed on HED, DHA and various peroxides (H_2O_2, t-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide) using an NADPH-coupled spectrophotometric method at 25 °C. The reaction is carried out in 500 μl of 30 mM Tris/HCl (pH 8.0) containing 200 μM NADPH, 0.5 unit of yeast glutathione reductase, and various concentrations of HED (31.25–1500 μM) at a fixed GSH concentration of 4 mM or various concentrations of DHA (31.25–2000 μM) at a fixed GSH concentration of 2 mM. For peroxidase activities, experiments were performed with only 1 mM GSH and 1 mM H_2O_2, 1 mM t-butyl hydroperoxide or 1 mM cumene hydroperoxide to limit spontaneous reactions. After 5 min of incubation at 25 °C, the reaction was started by the addition of recombinant GSTLs. For all proteins, this concentration is within the linear response range of the enzyme. The decrease in A_{340} was monitored using a Cary 50 spectrophotometer (Varian) and the turnover numbers were determined after subtracting the spontaneous activity rate observed in the absence of recombinant protein.

Glutathionylation activity has been tested towards CDNB, phenethyl-ITC and PNP butyrate (*p*-nitrophenyl butyrate) by monitoring the absorbance at 340, 274 or 412 nm respectively. Reactions were performed in 500 μl of 30 mM Tris/HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA for CDNB and PNP butyrate or in 500 μl of 100 mM phosphate buffer (pH 6.5) for phenethyl-ITC in the presence of 2 mM GSH and either 125–2000 μM CDNB or 25–400 μM ITC or 0.5 mM PNP butyrate. After 2 min of incubation, recombinant protein was added and the increase in absorbance was monitored using a Cary 50 spectrophotometer.

[1] To whom correspondence should be addressed (email arnaud.hecker@univ-lorraine.fr).

Atomic co-ordinates and structure factors have been deposited in the PDB under codes 4PQH and 4PQI for Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3 respectively.

Sequence data from this article can be found at the Phytozome portal using the following locus identifiers: *Potri.008G046800* for *Pt-GSTL1*, *Potri.016G083500* for *Pt-GSTL2* and *Potri.006G133500* for *Pt-GSTL3*.

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

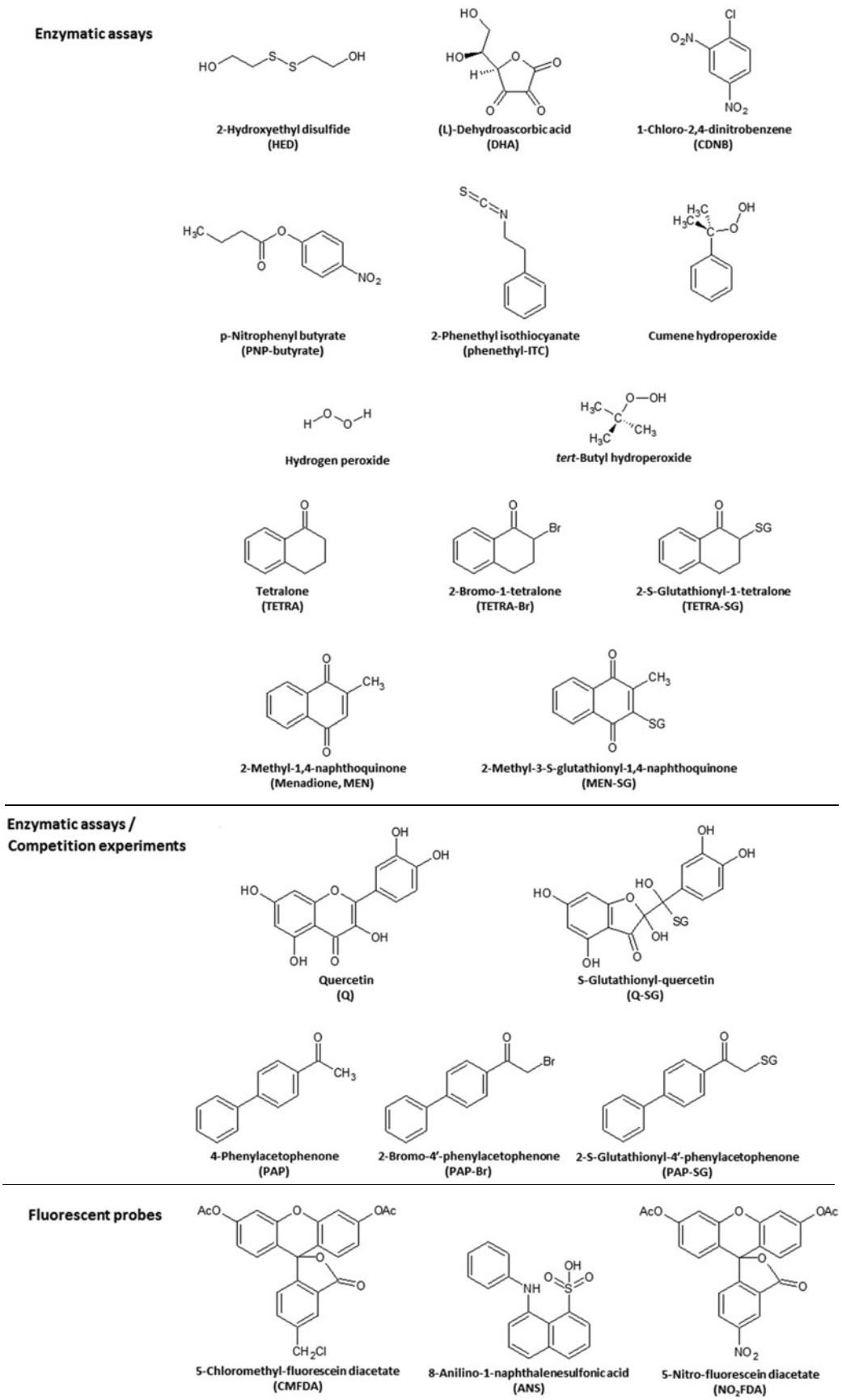


Figure S1 Chemical compounds used in the present study

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

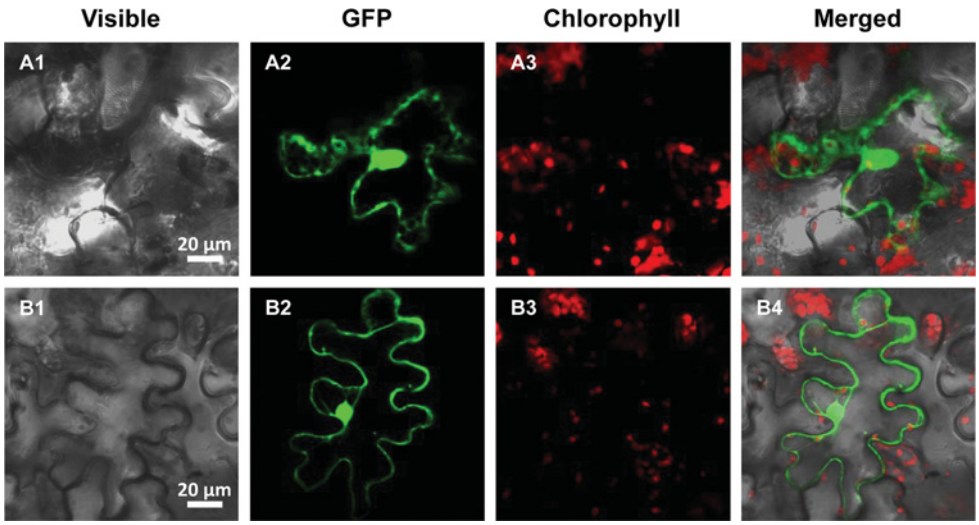


Figure S2 Subcellular localization of Pt-GSTL1 by GFP fusion

pCK-GFP3 and pSAT6-EGFP-C1 constructs respectively in which the sequences coding for full-length Pt-GSTL1 devoid of its N-terminal targeting sequence (**A**) and full-length Pt-GSTL1 (**B**) are fused in frame at the 5′ or 3′ end of a GFP-coding sequence, were used to bombard *N. benthamiana* young leaves. GFP was observed with a 505–550 nm bandpass filter and chloroplasts were visualized by the natural fluorescence of chlorophyll beyond 575 nm after excitation at 488 nm. The images correspond to epidermal cells. From left to right: 1, visible light; 2, fluorescence of the construct (green); 3, autofluorescence of chlorophyll (red); and 4, merged images.

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

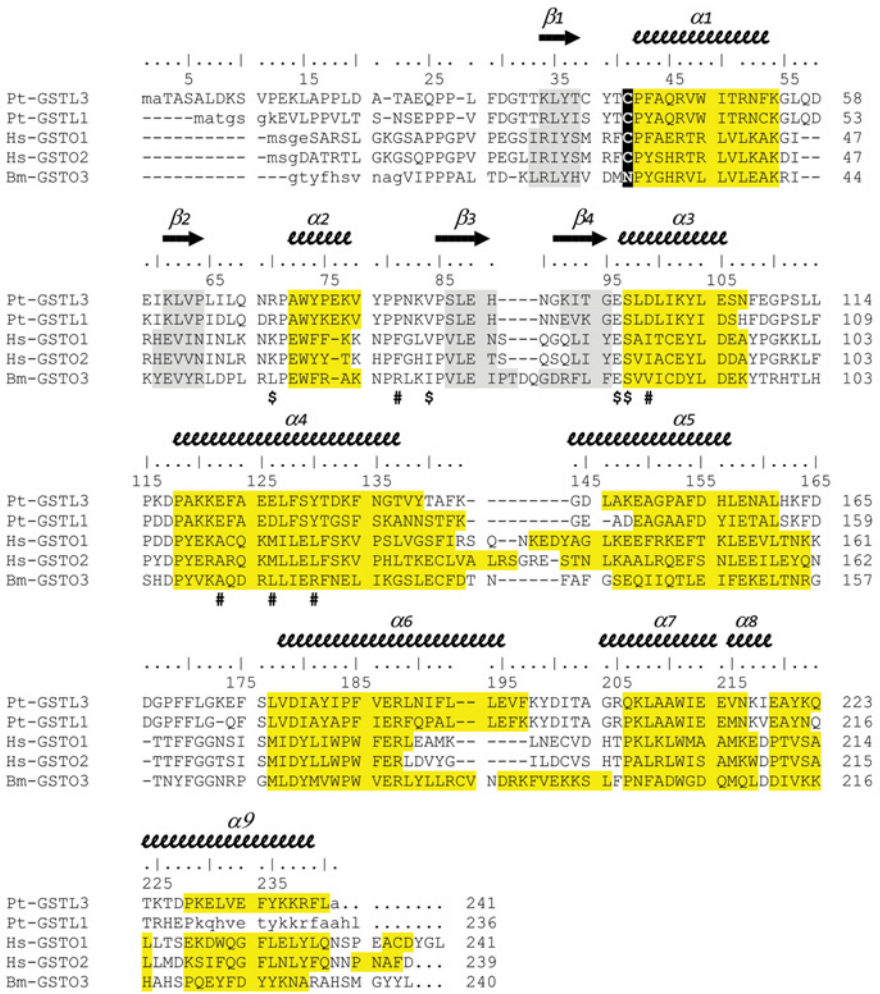


Figure S3 Sequence alignment based on structure superimposition

The sequences used correspond to proteins with solved 3D structures: Pt-GSTL1 and Pt-GSTL3, Hs-GSTO1 (PDB code 1EEM) and GSTO2 (PDB code 3Q18) and Bm-GSTO3 (*Bombyx mori* GSTO3) (PDB code 3RBT). Secondary structures of Pt-GSTL3 are labelled and shown using arrows (β-strands) and squiggles (helices). In each sequence, selected folded regions are highlighted in grey (β-strands) and yellow (helices). The catalytic cysteine residue of Pt-GSTL3, Pt-GSTL1, Hs-GSTO1 and Hs-GSTO2 is coloured white and highlighted in black. In Bm-GSTO3, this position is occupied by an asparagine residue, also coloured white and highlighted in black. The $ symbols indicate the positions of the residues which form an interaction with glutathione, as observed in the crystal structures of Pt-GSTL1, Pt-GSTL3 and Hs-GSTO1. The # symbols indicate the position of residues involved in the dimer interface in Hs-GSTO1 and Hs-GSTO2.

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

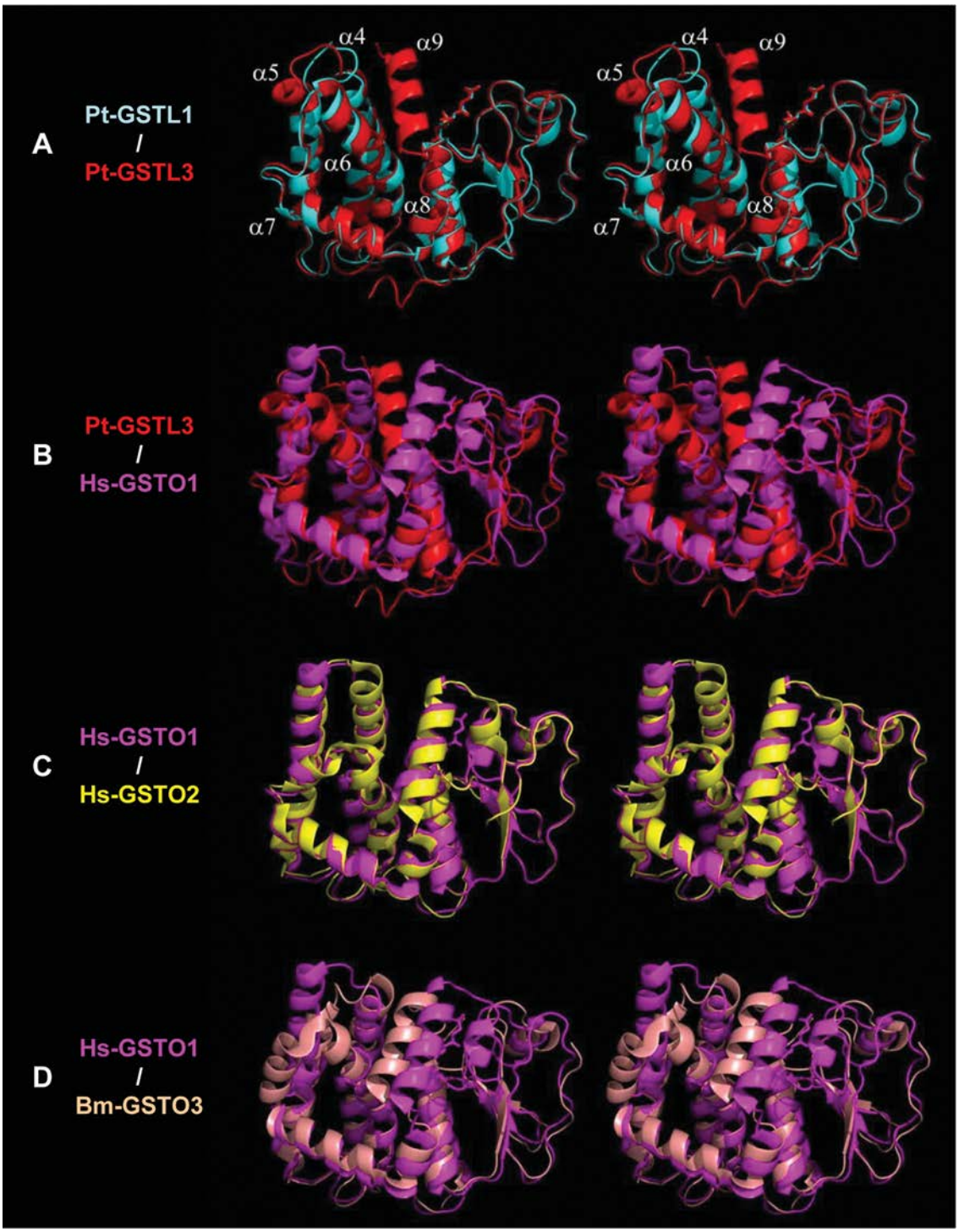


Figure S4 Stereo views of superimposed GSTL and GSTO structures

(**A**) Pt-GSTL1 (cyan) superimposed on Pt-GSTL3 (red). (**B**) Pt-GSTL3 (red) superimposed on Hs-GSTO1 (magenta). (**C**) Hs-GSTO1 (magenta) superimposed on Hs-GSTO2 (yellow). (**D**) Hs-GSTO1 (magenta) superimposed on Bm-GSTO3 (*Bombyx mori* GSTO3) (salmon). The helices of the C-terminal domain are labelled in (**A**). The enzymes are represented in cartoon ribbon style. When glutathione is present in the enzyme structure, it is shown as sticks.

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

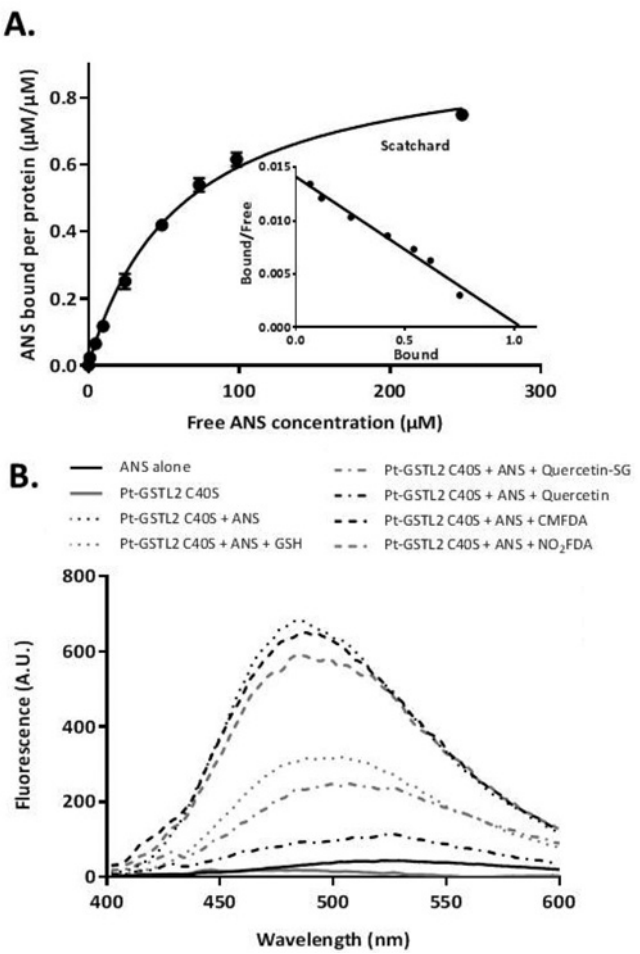


Figure S5 ANS binding to Pt-GSTL2 C40S

(**A**) Binding saturation curve of Pt-GSTL2 C40S with ANS and corresponding Scatchard plot (inset). (**B**) Fluorescence spectra (excitation at 385 nm) of 50 μM ANS bound to 3 μM Pt-GSTL2 C40S in the presence of 10 mM GSH and 30 μM quercetin, 3 μM quercetin-SG, 30 μM CMFDA or 30 μM NO_2FDA. Emission spectrum of 50 μM ANS alone is also shown as a control. A.U., arbitrary unit(s).

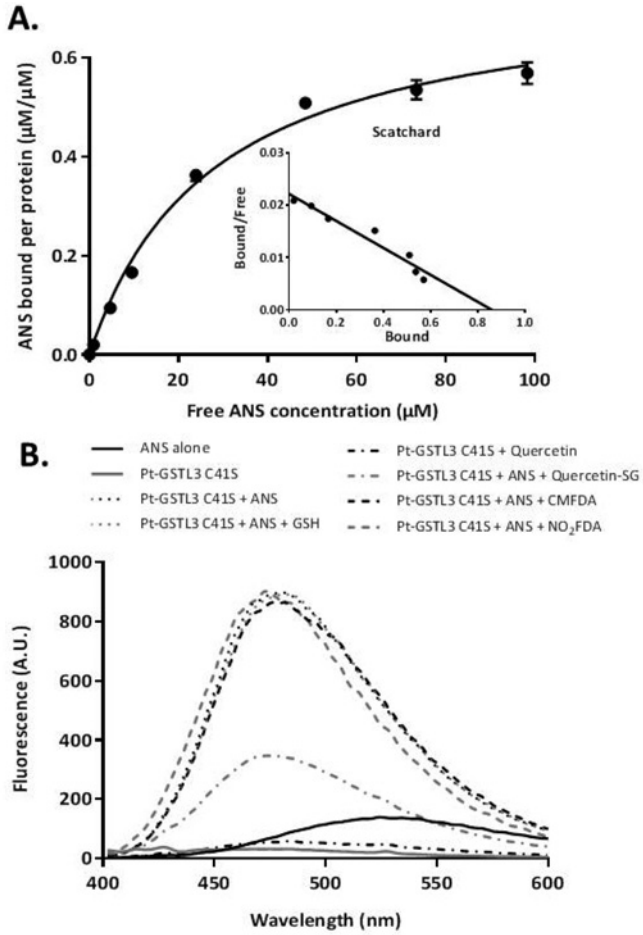


Figure S6 ANS binding to Pt-GSTL3 C41S

(**A**) Binding saturation curve of Pt-GSTL3 C41S with ANS and corresponding Scatchard plot (inset). (**B**) Fluorescence spectra (excitation at 385 nm) of 50 μM ANS bound to 3 μM Pt-GSTL3 C41S in the presence of 10 mM GSH and 30 μM quercetin, 3 μM quercetin-SG, 30 μM CMFDA or 30 μM NO_2FDA. Emission spectrum of 50 μM ANS alone is also shown as a control. A.U., arbitrary unit(s).

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

Table S1 Oligonucleotides used in the present study

Underlining in the sequence corresponds to the target sequence of the restriction endonuclease underlined in the primer name; bold in the sequence corresponds to the emboldened His_6 tag in the primer name.

Name	Sequence
Cloning in pCK-GFP vector	
Pt-GSTL1 (*Potri.008G046800*)	
GSTL1-NcoI-For1 (MATLL)	5′-ggggggggCCATGGCCACATTACTGCCCATG-3′
GSTL1-NcoI-For2 (MATGS)	5′-ggggggggCCATGGCTACTGGAAGCGGGAAAG-3′
GSTL1-BamHI-Rev	5′-ggggggggGGATCCAGATGAGCCGCAAAGCGTTTC-3′
Pt-GSTL2 (*Potri.016G083500*)	
GSTL2-NcoI-For	5′-ggggggggCCATGGCTGCTGCTGCTTTGG-3′
GSTL2-BbsI/BamHI-Rev	5′-ggggggggGAAGACCGGATCCGCCATAAAGCGCTTCTTGTAAACTTC-3′
Pt-GSTL3 (*Potri.006G133500*)	
GSTL3-5′UTR-For1	5′-GAGCCTGAAACCACTTGCAC-3′
GSTL3-5′UTR-For2	5′-CTTCAACTTGCTGCTTGCTG-3′
GSTL3-3′UTR-Rev	5′-GCCCTTGAACTCAAAGCAAC-3′
GSTL3A-NcoI-For (MATASA)	5′-ggggggggCCATGGCGACTGCTTCTGCTTTG-3′
GSTL3B-NcoI-For (MGS)	5′-ggggggggCCATGGGAAGTTTGGATAAGAGC-3′
GSTL3-BbsI/BamHI-Rev	5′-ggggggggGAAGACCGGATCCGCCAAAAAGCGCTTCTTG-3′
Cloning in pSAT6-EGFP-C1 vector	
Pt-GSTL1	
GSTL1-pSAT6-C1-BglII-For	5′-ggggggggAGATCTGCTACTGGAAGCGGGAAAGAAG-3′
GSTL1-pSAT6-C1-BamHI-Rev	5′-ggggggggGGATCCTCAAAGATGAGCCGCAAAGCG-3′
Cloning in pET-28a vector	
Pt-GSTL1	
GSTL1-NcoI-For2	5′-ggggggggCCATGGCTACTGGAAGCGGGAAAG-3′
GSTL1-NotI-Rev	5′-ggggggggGCGGCCGCTCAAAGATGAGCCGCAAAGCG-3′
Pt-GSTL2	
GSTL2-NcoI-For	5′-ggggggggCCATGGCTGCTGCTGCTTTGG-3′
GSTL2-NotI-Rev	5′-ggggggggGCGGCCGCCTAAGCCATAAAGCGCTTCTTGTAAAC-3′
Pt-GSTL3	
GSTL3A-NcoI-For (MATASA)	5′-ggggggggCCATGGCGACTGCTTCTGCTTTG-3′
GSTL3B-NcoI-For (MGS)	5′-ggggggggCCATGGGAAGTTTGGATAAGAGC-3′
GSTL3-NotI-**His_6**-Rev	5′-ggggggggGCGGCCGCCTA**GTGATGGTGATGGTGATG**AGCCAAAAAGCGCTTCTTG-3′
Mutagenesis	
Pt-GSTL1	
GSTL1-C36S-For	5′-TTGTATATATCGTACACAAGTCCCTATGCACAGCGTG-3′
GSTL1-C36S-Rev	5′-CACGCTGTGCATAGGGACTTGTGTACGATATATACAA-3′
GSTL1-C36A-For	5′-ACAACAAGGTTGTATATATCGTACACAGCTCCCTATGCACAGC-3′
GSTL1-C36A-Rev	5′-GCTGTGCATAGGGAGCTGTGTACGATATATACAACCTTGTTGT-3′
Pt-GSTL2	
GSTL2-C40S-For	5′-TTGTATACATGCTACACTAGTCCATTTGCCCATCGAG-3′
GSTL2-C40S-Rev	5′-CTCGATGGGCAAATGGACTAGTGTAGCATGTATACAA-3′
GSTL2-C40A-For	5′-ACTACCAAGTTGTATACATGCTACACTGCTCCATTTGCCCATC-3′
GSTL2-C40A-Rev	5′-GATGGGCAAATGGAGCAGTGTAGCATGTATACAACTTGGTAGT-3′
Pt-GSTL3	
GSTL3-C41S-For	5′-GTATACATGCTACACGAGTCCATTTGCCCAGCG-3′
GSTL3-C41S-Rev	5′-CGCTGGGCAAATGGACTCGTGTAGCATGTATAC-3′
GSTL3-C41A-For	5′-ATTGTATACATGCTACACGGCTCCATTTGCCCAGCGAGTT-3′
GSTL3-C41A-Rev	5′-AACTCGCTGGGCAAATGGAGCCGTGTAGCATGTATACAAT-3′
RT–PCR	
Pt-GSTL1	
GSTL1-RT-For	5′-ATGGCTACTGGGAGCGGGAAA-3′
GSTL1-RT-Rev	5′-TCAAAGATGAGCCACAAAGCGTTT-3′
Pt-GSTL2	
GSTL2-RT-For	5′-GCGCACCTCTTAACTGTCACT-3′
GSTL2/3-RT-Rev	5′-AAAGCGCTTCTTGTAAA-3′
Pt-GSTL3	
GSTL3A-RT-For	5′-ATTCCATGGCGACTGCTTCTGC-3′
GSTL3B-RT-For	5′-CCTTTTGTTTTCCAAATGGGAAG-3′
Pt-UBQ (*Potri.015G013600*)	
UBQ-RT-For	5′-GCAGGGAAACAGTGAGGAAGG-3′
UBQ-RT-Rev	5′-GCTCTGGACTCACGAGGACAG-3′

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

Table S2 Theoretical molecular masses and molecular masses of recombinant proteins determined by MS and FPLC

Protein	Theoretical mass (Da)	Native (Da)	Reduced (Da)	Mass determined by FPLC (Da)
Pt-GSTL1	26830	26699/27004 (+ 305)	26699	29300 (monomer)
Pt-GSTL1 C36S	26814	26683	26683	29500 (monomer)
Pt-GSTL2	27361	27230/27535 (+ 305)	27230	29900 (monomer)
Pt-GSTL2 C40S	27345	27214	27214	29800 (monomer)
Pt-GSTL3A	28320	28189/28494 (+ 305)	28189	28400 (monomer)
Pt-GSTL3A C41S	28304	28173	28173	29200 (monomer)

Received 27 March 2014/13 May 2014; accepted 14 May 2014
Published as BJ Immediate Publication 14 May 2014, doi:10.1042/BJ20140390

© The Authors Journal compilation © 2014 Biochemical Society

3. **Article 4 : Glutathionyl-hydroquinone reductases from poplar are plastidial proteins which deglutathionylate glutathione-conjugated reduced and oxidized quinones**

Pierre-Alexandre Lallement, Edgar Meux, José M. Gualberto, Stéphane Dumarcay, Frédérique Favier, Claude Didierjean, Frederick Saul, Ahmed Haouz, Mélanie Morel-Rouhier, Eric Gelhaye, Nicolas Rouhier et Arnaud Hecker

FEBS Letters, en révision

L'étude phylogénétique présentée au début de ce chapitre (article 1) a contribué à l'identification de glutathionyl-hydroquinone réductases (GHRs) chez les plantes alors qu'elles n'avaient été identifiées et étudiées jusqu'ici que chez les bactéries et les champignons. Chez le peuplier, les GHRs sont codées uniquement par deux gènes qui ont été appelés *PtGHR1* et *PtGHR2*, alors que quatre gènes sont présents chez *A. thaliana* par exemple. L'étude de l'expression tissulaire de ces deux gènes a montré qu'ils sont principalement exprimés dans les organes reproducteurs tels que les fleurs et les fruits bien que l'expression de *PtGHR2* semble moins forte que celle de *PtGHR1* et limitée à certains tissus. L'observation *in vivo* de protéines chimériques fusionnées à la GFP a montré qu'elles sont toutes les deux localisées dans les chloroplastes, PtGHR2 étant plus particulièrement associée aux nucléoïdes. Bien que la protéine PtGHR1 catalyse des réactions de type thiol-transférases et la réduction du DHA, les GHRs semblent particulièrment impliquées dans la déglutathionylation de quinones. PtGHR1 peut ainsi également déglutathionyler les dérivés de quinones mais pas la tétralone et la phényl-acétophénone. Bien que capables de reconnaitre à la fois les dérivés réduits et les dérivés oxydés de quinones glutathionylés, les GHRs ont une préférence nettement supérieure pour les dérivés réduits, les hydroquinones. Au niveau structural, PtGHR1 adopte le repliement typique des GHRs avec une interface de dimérisation tout à fait comparable à celle trouvée pour ses homologues bactériens et fongiques.

*Manuscript text
Click here to view linked References

Glutathionyl-hydroquinone reductases from poplar are plastidial proteins which deglutathionylate glutathione-conjugated reduced and oxidized quinones

Pierre-Alexandre LALLEMENT[a,b], Edgar MEUX[a,b], José M. GUALBERTO[c], Stéphane DUMARCAY[d], Frédérique FAVIER[e,f], Claude DIDIERJEAN[e,f], Frederick SAUL[g], Ahmed HAOUZ[g], Mélanie MOREL-ROUHIER[a,b], Eric GELHAYE[a,b], Nicolas ROUHIER[a,b] and Arnaud HECKER[a,b,*]

[a] Université de Lorraine, Interactions Arbres - Microorganismes, UMR1136, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

[b] INRA, Interactions Arbres - Microorganismes, UMR1136, F-54280 Champenoux, France

[c] Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS-UPR 2357, 67084 Strasbourg, France

[d] Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois, EA 1093, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France.

[e] Université de Lorraine, CRM^2, Equipe BioMod, UMR 7036, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

[f] CNRS, CRM^2, Equipe BioMod, UMR 7036, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

[g] Institut Pasteur, Plate-Forme de Cristallographie, CNRS-UMR3528, 75724 Paris, France

[*] To whom correspondence should be addressed: Université de Lorraine, Interactions Arbres - Microorganismes, UMR1136, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Tel ++ 33 3 83684228

Email: arnaud.hecker@univ-lorraine.fr

Abstract

Glutathionyl-hydroquinone reductases (GHRs) catalyze the deglutathionylation of quinones *via* a catalytic cysteine. Two genes (*Pt-GHR1* and *Pt-GHR2*) are present in the *Populus trichocarpa* genome and they are primarily expressed in reproductive organs. Both proteins are localized in plastids, more particularly in nucleoids for Pt-GHR2. At the structural level, Pt-GHR1 adopts a typical GHR fold, with a dimerization interface quite comparable to those found in bacterial and fungal counterparts. Pt-GHR1 catalyzes the deglutathionylation of both reduced and oxidized glutathionylated quinones but with a better catalytic efficiency for the reduced forms.

Keywords: Deglutathionylation; glutathione transferases; plastids; poplar

Highlights

- Poplar GHRs are found exclusively in plastids, particularly in reproductive organs
- Poplar GHR1 catalyzes the deglutathionylation of oxidized and reduced quinones
- The residues forming the dimeric interface of poplar GHR1 are conserved

1. Introduction

Recent plant genome analyses identified at least 14 classes of glutathione transferases (GSTs), namely Tau, Phi, Zeta, Theta, Lambda, EF1Bγ, Metaxin, Ure2p, Hemerythrin, Iota, TetraChloroHydroQuinone Dehalogenase (TCHQD), Dehydroascorbate reductase (DHAR), microsomal ProstaGlandin E-Synthase type 2 (mPGES-2) and Glutathionyl-Hydroquinone Reductases (GHRs) [1-4]. These GHRs, which are found in bacteria, haloarchaea, fungi and plants, constitute a newly defined GST class due to their ability to reduce glutathionyl-quinones, but not glutathionyl-acetophenone derivatives unlike the closely related Omega GSTs (GSTOs/GTOs) [5-9]. In bacteria, GHRs participate to the reductive dehalogenase pathway as shown for *Sphingobium chlorophenolicum* PcpF, whereas the role of *Escherichia coli* YqjG is not clearly established [6, 10]. In *Saccharomyces cerevisiae,* the three GHRs were initially referred to as GTO1, GTO2/ECM4 and GTO3 and GTO1 was shown to be involved in sulfur metabolism [11]. In plants, the physiological substrates and functions of GHRs are unknown.

GHRs exhibit a quite conserved CPWA active site sequence, thus belonging to the cysteine-containing GSTs (Cys-GSTs), which also include GSTOs, Lambda and Beta GSTs (GSTLs and GSTBs) and DHARs [12-14]. The presence of the catalytic cysteine is required for deglutathionylation activities [6, 8, 9, 15] as for other Cys-GSTs and glutaredoxins (Grxs) [16, 17]. Unlike canonical GSTs, GHRs adopt a particular dimeric quaternary arrangement, defining a new GST structural class named Xi [8, 18]. In these proteins, the two monomers associate exclusively via their α-helical domains. Another difference is the presence of a sequence insertion between α2 and β2 and of a unique C-terminal extension. Moreover, the active site contains a conserved tyrosine triad which provides an acid/base catalytic assistance in the reaction mechanism [18].

We report the first characterization of the plant GHR family by studying the transcript level and subcellular localization of the two *Populus trichocarpa* representatives (Pt-GHR1 and Pt-GHR2), and analyzing the enzymatic and structural properties of Pt-GHR1.

2. Materials and Methods

2.1. RT-PCR experiments

RNA extraction from eight *P. trichocarpa* tissues and cDNA synthesis were performed as described by Lallement *et al*. [16]. Transcripts of Pt-GHR1 (Potri.015G121600), Pt-GHR2

(Potri.014G192300) and ubiquitin (Potri.015G013600), used as the reference, gene were amplified by PCR (25, 30 or 35 cycles) using specific primer pairs (Table S1).

2.2. Subcellular localization of GFP fusion proteins

Pt-GHR1 and *Pt-GHR2* coding sequences, with or without the sequences coding for transit peptides, were amplified by PCR from petiole cDNAs with the primers shown in Table S1 and cloned in the pCK-GFP3 vector, upstream and in frame with the GFP coding sequence [19]. Young leaves of *Nicotiana benthamiana* were transfected by bombardment as described before [16]. After 18 h, fluorescence of GFP and chlorophyll were observed in leaves respectively at 505-550 nm and beyond 575 nm after excitation at 488 nm on a Zeiss LSM510 confocal microscope.

2.3. Cloning in bacterial expression vectors and site-directed mutagenesis

Sequences coding for Pt-GHR1 and Pt-GHR2 devoid of the targeting sequences were inserted into pET-28a vector using primers shown in Table S1. For Pt-GHR1, the expressed protein is devoid of the first 34 amino acids. For Pt-GHR2, three constructs deprived of the 54, 57 and 86 N-terminal amino acids were tested. The catalytic cysteine of Pt-GHR1 was substituted by a serine (C49S) or an alanine (C49A) from pET-28a::Pt-GHR1 using mutagenic oligonucleotides (Table S1) and the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies).

2.4. Protein expression and purification

The *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS strain transformed with pET-28a::Pt-GHR1 wild-type and mutants was grown at 37°C in LB medium containing kanamycin (50 $\mu g.ml^{-1}$) and chloramphenicol (34 $\mu g.ml^{-1}$). At OD_{600nm} of 0.7, 0.5% (v/v) of ethanol was added to the medium and cells were cooled to 4°C for 3 h. Protein expression was subsequently induced for 16 h at 20°C with 0.1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside. Cells were harvested and resuspended in a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl buffer. After lysis by sonication, the cell extract was centrifuged (35,000 g, 25 min, 4°C). After differential fractionation with ammonium sulfate (40 and 80% saturation), recombinant proteins were purified by size exclusion chromatography (Ultrogel® ACA44, Biosepra) and then by ion exchange chromatography (DEAE-cellulose column, Sigma). The purified proteins were stored in 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl buffer at -20°C and concentrations were determined using theoretical molar absorption coefficients of 55997.5 $M^{-1}.cm^{-1}$ for Pt-GHR1

and 55935 $M^{-1}.cm^{-1}$ for Pt-GHR1 C49S and C49A variants. *Phanerochaete chrysosporium* GHR1 (Pc-GHR1) and *E. coli* YqjG (Ec-YqjG) were obtained as described previously [8].

2.5. Determination of the oligomerization states and molecular masses

Native or reduced GHRs were analyzed either by mass spectrometry as described previously [8] or by size exclusion chromatography onto a calibrated Superdex 200 10/300 column (GE Healthcare). Reduced proteins were obtained by incubation for 1 h with a 10 fold excess of dithiothreitol (DTT) at room temperature.

2.6. Crystallization and structure determination of recombinant Pt-GHR1

Details of crystallization, data collection and structure determination of Pt-GHR1 are described in Supplementary Materials and Methods. Atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank under the accession code 4USS.

2.7. Substrate preparation

Glutathionylated phenylacetophenone (PAP-SG), menadione (MEN-SG) tetralone (TETRA-SG) and quercetin (Q-SG) were prepared as previously described [16, 20-22] and analyzed by mass spectrometry. To generate menadiol-SG, 3 mM $NaBH_4$ were added to menadione-SG immediately before enzymatic analysis to avoid rapid re-oxidation into menadione-SG. The substrates (menadione-SG and menadiol-SG) and enzymatic products (menadione and menadiol) were analyzed by LC-MS. Liquid chromatography was performed at 40°C on a Luna C18 100A column (2 mm x 150 mm, 3 µm, Phenomenex) with a 20 series Shimadzu Prominence UPLC system. The elution was performed with a methanol gradient in water containing 0.1% formic acid. Mass spectrometry detection was carried out with a Shimadzu TQD LC-MS8030 simultaneously in positive and negative ion mode after electrospray ionization.

2.8. Enzymatic activities

Thiol-transferase and DHAR activities were tested using hydroxyethyl disulfide (HED) and DHA respectively, peroxidase activity using H_2O_2, ter-butyl-hydroperoxide or cumene hydroperoxide, deglutathionylation activity using PAP-SG, TETRA-SG and Q-SG, esterase activity using 5-chloromethyl-fluorescein diacetate (Green CMFDA©, Invitrogen) and glutathionylation activity using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), phenethyl-

isothiocyanate (phenethyl ITC) and p-nitrophenyl butyrate (PnP butyrate). All these procedures have been described previously [16].

Deglutathionylation of menadione-SG/menadiol-SG was assayed in 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA buffer by following the appearance of deglutathionylated products. The reaction was initiated by adding enzymes, and stopped after 20 sec by adding a final concentration of 35% (v/v) ethanol and vigorous mixing. After centrifugation (14,000 g for 15 min), the reaction products were analyzed by HPLC using a calibrated Gemini 5µ C18 110A column (3 mm x 150 mm, Phenomenex) equilibrated with water containing 30 mM acetic acid pH 4.16 and 10% acetonitrile at 20°C by monitoring absorbance at 250 nm. The nature of reaction products was confirmed by LC-MS (see above).

Deglutathionylation of GSH-conjugated 1,4-benzoquinone (BQ-SG) and 2-chloro-1,4-benzoquinone (ClBQ-SG) was measured by spectrophotometric assays at 25°C in a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA buffer. Molar extinction coefficients of BQ-SG and ClBQ-SG (respectively ε_{309nm}=2451 $M^{-1}.cm^{-1}$ and ε_{318nm}=3124 $M^{-1}.cm^{-1}$) were determined after complete reaction of known quinone concentrations with GSH [23]. The wavelengths were selected for maximal differences in the absorption spectra of GSH-conjugated *vs* non-conjugated quinones. To determine kinetic parameters, the decrease in absorbance was monitored after adding enzymes (0.2 to 1 µM depending on the substrates) to varying concentrations of BQ and ClBQ (5 to 280 µM) with 4 mM GSH.

For all activity assays, three independent experiments were performed at each substrate concentration. K_m and k_{cat} values were calculated with a Michaelis-Menten non-linear regression model using GraphPad Prism 5 software.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of gene expression and subcellular localization of poplar GHRs

Two GHR genes, *Pt-GHR1* and *Pt-GHR2*, were identified in the *Populus trichocarpa* genome. The corresponding proteins exhibit the characteristic CPWA signature and an N-terminal sequence which is predicted to be a chloroplastic targeting signal. The major difference compared to GSTLs and GSTOs is the presence of an insertion of about 40 residues in the N-terminal domain and a final C-terminal extension of 50-60 residues. According to the presence of an N-terminal targeting sequence, the transient expression of GHR::GFP fusions in tobacco leaves revealed chloroplastic localizations for both proteins (Figures 1A and 1B). Control experiments performed with sequences devoid of the transit

peptide resulted in cytosolic localization (Figures 1C and 1D). For Pt-GHR2, the fluorescence signal was observed in structures likely corresponding to nucleoids (Figure 1B). This localization raises questions concerning its physiological function and in particular the nature of Pt-GHR2 substrates. In order to investigate the tissular gene expression pattern of *Pt-GHR1* and *Pt-GHR2*, RT-PCR experiments were performed from eight different tissues of a naturally growing *P. trichocarpa* tree (Figure 2). *Pt-GHR1* transcripts were detected in all tissues tested but were more abundant in female flowers and fruits. Although *Pt-GHR2* transcripts were primarily found in female flowers, they could also be detected in stamens, fruits, petioles and leaves after 35 PCR cycles. Considering the observed chloroplastic localization of GHRs in tobacco leaves, it is surprising that the transcripts are present primarily in reproductive organs but are almost absent in leaves of the adult tree. These expression patterns indicate that they may have a more general plastidial localization and that they could have specialized functions related to the metabolism of these specific organs.

3.2. *Poplar recombinant GHR1 is a dimeric enzyme isolated in a glutathionylated form*

For biochemical and structural investigations, the mature forms of Pt-GHR1 and Pt-GHR2 were expressed in *E. coli* as recombinant proteins. After purification, 30 mg of soluble protein per liter of culture were obtained for Pt-GHR1. Three different Pt-GHR2 constructs were tested (untagged or with C-terminal hexahistidine- or strep-tags) but they were totally insoluble or present as soluble aggregates without enzymatic activity. Thus, only Pt-GHR1 and variants whose catalytic cysteine residue was replaced by a serine (C49S) or an alanine (C49A) were characterized. Using analytical size exclusion chromatography, both Pt-GHR1 and Pt-GHR1 C49S were eluted as a single peak corresponding to an apparent molecular weight of about 78 kDa (Table S2), compatible with a dimeric organization in solution similar to other reported GHRs [8, 18]. Mass spectrometry analyses showed that Pt-GHR1 was present as two separated species, one with a molecular weight corresponding to a protein in which the N-terminal methionine is cleaved and another one with an additional mass increment of 305 Da (Table S2). On the contrary, Pt-GHR1 C49S and reduced Pt-GHR1 are present as single species with cleaved methionines. These results indicated that a glutathione moiety is covalently bound to the catalytic cysteine, as already observed in other Cys-GSTs and Grxs [8, 12, 13, 16, 17, 20]. Accordingly, a single species with a 305 Da increment was observed after treating reduced Pt-GHR1 with oxidized glutathione (GSSG).

3.3. Structural analysis of poplar GHR1

The crystal structure of Pt-GHR1 in complex with glutathione was determined to a resolution of 2.5 Å (Table 1). Pt-GHR1 crystallized in the space group $P2_12_12$ with one monomer in the asymmetric unit. Continuous electron density was seen from residues 18 to 323. The dimer is generated by a crystallographic two-fold axis (Figure 3A). Initial Fourier difference maps revealed significant electron density attributed to glutathione in the G-site (Figure 3B). The distance of 3.2 Å between the sulfur atoms of glutathione and of Cys49 did not fall within the range of expected disulfide bond length (~ 2.05 Å). Since GSH was covalently bound to recombinant Pt-GHR1, the intermolecular disulfide bridge was most likely cleaved during the X-ray data collection.

The Pt-GHR1 monomer consists of an N-terminal thioredoxin-like motif (β1α1β2α2β3β4α3) and an α-helical C-terminal domain (α4α5α6α7α8α9) (Figure 3A). The monomer-monomer interactions are formed exclusively by the C-terminal domains as in other available Xi GST structures (Pc-GHR1, 3PPU; Ec-YqjG, 4G0I; Sc-PcpF, 4FQU; *Corynebacterium glutamicum* GSTX, 3M1G; *Gordonia bronchialis* GSTX, 4PTS) (Figure S1) [8, 18, 24, 25].

In Pt-GHR1, the catalytic tyrosine triad which provides the proton needed for reductive deglutathionylation [18] is conserved in the active site at positions 192, 250 and 293 in helices α4, α6 and α9 helices, respectively. The glutathione molecule forms hydrogen bonds with V129 and S145 main chain atoms and with W89, E144 and S145 side chains (Figure 3B). Of these residues, only W89 is specific to GHRs. Interestingly, the E144-S145 pair, well conserved in most GST classes, is replaced by D150-Y151 and D139-F140 pairs in Cg-GSTX and Gb-GSTX, respectively. In both cases, aromatic side chains occupy the G-site and would preclude glutathione binding raising the question of the GHR activity of these GSTXs.

Residues delimitating the H-site have been identified previously from the crystal structure of Ec-YqjG in complex with glutathionyl-menadione [18]. The corresponding residues, W51 from the CPWA active site motif, Y184, N189, Y192, F196 in α4 and H297 in α9 are conserved in Pt-GHR1 and maintain a similar H-site architecture (Figure 3C). Interestingly, the H-site residues of GSTO and GSTL proteins are more variable from one organism to another. This could be due to the ability of GSTOs and GSTLs to deglutathionylate a broader substrate spectrum compared to GHRs that are specialized in quinone-SG reduction.

3.4. Enzymatic properties of Pt-GHR1

The enzymatic activities of Pt-GHR1 and mutated variants were assayed for various substrates. No significant peroxidase, esterase or glutathionylation activities were detected,

whereas Pt-GHR1 exhibited deglutathionylation activities for HED and DHA (Table 2). Although Pt-GHR1 exhibited comparable affinities toward DHA and HED (770 and 400 µM respectively), the catalytic efficiency for HED is about 30 fold greater essentially due to higher turnover (29.40 s^{-1} for HED *vs* 1.85 s^{-1} for DHA). Nevertheless, the recorded catalytic efficiencies and turnover numbers are of the same order of magnitude as those obtained for fungal GSTOs [20], bacterial (Ec-YqjG and Sc-PcpF) [6] and fungal (Pc-GHR1) [8] GHRs and plant GSTLs [16].

Then, we tested glutathionyl-quinone derivatives (MEN-SG, BQ-SG and one chlorinated derivative ClBQ-SG), glutathionyl-ketone derivatives usually recognized by GSTLs or GSTOs (PAP-SG or TETRA-SG) [16, 20] and glutathionyl-flavonol derivative (Q-SG), as a representative GSTL substrate [26]. Pt-GHR1 was able to deglutathionylate all quinone derivatives and Q-SG (Tables 2 and 3). For Q-SG, although Pt-GHR1 exhibits a high apparent affinity (K_m of 2.68 µM), the velocity (0.013 s^{-1}) and thus the catalytic efficiency are weak, as found with Pt-GSTLs [16] and Grxs (data not shown). These results suggest that Q-SG reduction may represent some sort of diaphorase activity linked to the presence of an exposed reactive cysteine. Concerning quinone derivatives, catalytic efficiencies range from 1.74 $x10^4$ $M^{-1}.s^{-1}$ for MEN-SG to 1.10 $x10^5$ $M^{-1}.s^{-1}$ for ClBQ-SG. Although Pt-GHR1 displays activity towards HED, DHA and Q-SG, the observation that GHRs are the only plant Cys-GSTs catalyzing the deglutathionylation of GSH-conjugated quinones and with the best catalytic parameters (Table 2) suggests that they might represent physiological substrates. All enzymatic activities are dependent on the presence of the catalytic cysteine since Pt-GHR1 C49S displayed less than 1% activity compared to Pt-GHR1 and the activity of Pt-GHR1 C49A was totally abolished (Table 2).

3.5. *Activity with glutathionylated quinones: oxidized vs reduced forms*

Previous studies showed that several bacterial and fungal GHRs are able to deglutathionylate glutathionyl-hydroquinone forms, but not a glutathionyl-benzoquinone as menadione-SG [9], unlike Pc-GHR1 [8]. Thus, menadione-SG was used to investigate the properties of Pt-GHR1 in comparison to Pc-GHR1 and Ec-YqjG. *In vitro* synthesized menadione-SG led to the formation of two different products that could be separated by HPLC, a minor peak with a molecular mass of 479 Da and a major peak with a molecular mass of 477 Da, consistent with menadiol-SG and menadione-SG respectively. These two forms can also be differentiated from their UV/visible absorbance spectra since menadione-SG exhibits a characteristic absorption band centered at 430 nm which is absent in menadione and menadiol-SG spectra

(Figure 4A). We have also verified that $NaBH_4$, but not GSH, was able to reduce menadione-SG into menadiol-SG in solution. When menadione-SG was incubated with pre-reduced Pt-GHR1, Ec-YqjG or Pc-GHR1 or with native glutathionylated proteins in the presence of GSH or $NaBH_4$, a single product with a molecular mass of 172 Da and a UV/visible spectrum similar to menadione was detected, indicating that all enzymes can deglutathionylate both menadione-SG and menadiol-SG. For $NaBH_4$-treated samples, the fact that only menadione was detected can be explained by the rapid oxidation of menadiol into menadione. In single turnover experiments using reduced proteins in the absence of GSH, subsequent mass spectrometry analyses indicated that the proteins are glutathionylated. Hence, as reported for some GHRs, GSTOs or GSTLs, a glutathionylated enzyme likely constitutes a catalytic intermediate [8, 16, 20]. Complementary kinetic experiments were carried out specifically on menadione-SG by monitoring the variation of absorbance at 430 nm with saturating amounts of GSH in the absence of $NaBH_4$. A decrease in the absorbance at 430 nm was observed only with Pt-GHR1, Pc-GHR1 or Ec-YqjG but not with cysteinic variants (Pt-GHR1 C49S, Pc-GHR1 C86S and Ec-YqjG C63S) (Figures 4B, S2 and S3). Enzymatic parameters were determined by following the decrease of menadione-SG or menadiol-SG concentration by HPLC. Overall, the three GHRs have comparable turnover numbers (k_{cat}) for the two substrates. However, apparent K_m values are responsible for large variations in catalytic efficiencies (Table 3). For example, Pt-GHR1 exhibits apparent K_m values of 273 µM and 3 µM respectively for menadione-SG and menadiol-SG resulting in a 185 fold higher catalytic efficiency towards menadiol-SG (3.22×10^6 $M^{-1}.s^{-1}$) as compared to menadione-SG (0.17×10^5 $M^{-1}.s^{-1}$). Hence, in contrast to *S. cerevisiae* ECM4 [9], all tested GHRs are able to catalyze the deglutathionylation of both menadione-SG and menadiol-SG, although with a clear preference for the latter. However, the question of the physiological substrates of plant GHRs is still open since the major quinone forms found in plastids/chloroplasts, plastoquinones, phylloquinones or α-tocopherol, are present in membranes and do not have electrophilic sites susceptible to react spontaneously with GSH via Michael addition.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from ANR as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). We thank Patrick Weber for performing robot-driven crystallization trials. We acknowledge SOLEIL for providing synchrotron radiation facilities, and we thank the staff of PROXIMA-1 beamline for assistance.

References

1. Jacquot, J. P., Dietz, K. J., Rouhier, N., Meux, E., Lallement, P. A., Selles, B. & Hecker, A. (2013) Redox Regulation in Plants: Glutathione and "Redoxin" Related Families in *Oxidative Stress and Redox Regulation* pp. 213-231, Springer Netherlands,
2. Liu, Y. J., Han, X. M., Ren, L. L., Yang, H. L. & Zeng, Q. Y. (2013) Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants, *Plant Physiol.* **161**, 773-86.
3. Rezaei, M. K., Shobbar, Z. S., Shahbazi, M., Abedini, R. & Zare, S. (2013) Glutathione S-transferase (GST) family in barley: Identification of members, enzyme activity, and gene expression pattern, *J Plant Physiol.* **170**, 1277-84.
4. Lallement, P. A., Brouwer, B., Keech, O., Hecker, A. & Rouhier, N. (In revision) The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants, *Frontiers in Pharmacology*.
5. Morel, M., Ngadin, A. A., Droux, M., Jacquot, J. P. & Gelhaye, E. (2009) The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Cell Mol Life Sci.* **66**, 3711-25.
6. Xun, L., Belchik, S. M., Xun, R., Huang, Y., Zhou, H., Sanchez, E., Kang, C. & Board, P. G. (2010) S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases, *Biochem J.* **428**, 419-27.
7. Belchik, S. M. & Xun, L. (2011) S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a new class of glutathione transferases functioning as oxidoreductases, *Drug Metab Rev.* **43**, 307-16.
8. Meux, E., Prosper, P., Ngadin, A., Didierjean, C., Morel, M., Dumarcay, S., Lamant, T., Jacquot, J. P., Favier, F. & Gelhaye, E. (2011) Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class, *J Biol Chem.* **286**, 9162-73.
9. Lam, L. K., Zhang, Z., Board, P. G. & Xun, L. (2012) Reduction of benzoquinones to hydroquinones via spontaneous reaction with glutathione and enzymatic reaction by S-glutathionyl-hydroquinone reductases, *Biochemistry.* **51**, 5014-21.
10. Huang, Y., Xun, R., Chen, G. & Xun, L. (2008) Maintenance role of a glutathionyl-hydroquinone lyase (PcpF) in pentachlorophenol degradation by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723, *J Bacteriol.* **190**, 7595-600.
11. Barreto, L., Garcera, A., Jansson, K., Sunnerhagen, P. & Herrero, E. (2006) A peroxisomal glutathione transferase of *Saccharomyces cerevisiae* is functionally related to sulfur amino acid metabolism, *Eukaryotic cell.* **5**, 1748-59.
12. Dixon, D. P., Davis, B. G. & Edwards, R. (2002) Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*, *J Biol Chem.* **277**, 30859-69.
13. Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L. S., Schulte, G. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V., Rosner, M. H., Chrunyk, B. A., Perregaux, D. E., Gabel, C. A., Geoghegan, K. F. & Pandit, J. (2000) Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases, *J Biol Chem.* **275**, 24798-806.
14. Rossjohn, J., Polekhina, G., Feil, S. C., Allocati, N., Masulli, M., Di Illio, C. & Parker, M. W. (1998) A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications, *Structure.* **6**, 721-34.
15. Garcera, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J. & Herrero, E. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases, *Biochem J.* **398**, 187-96.

16. Lallement, P. A., Meux, E., Gualberto, J. M., Prosper, P., Didierjean, C., Saul, F., Haouz, A., Rouhier, N. & Hecker, A. (2014) Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants, *Biochem J.* **462**, 39-52.
17. Couturier, J., Jacquot, J. P. & Rouhier, N. (2013) Toward a refined classification of class I dithiol glutaredoxins from poplar: biochemical basis for the definition of two subclasses, *Front Plant Sci.* **4**, 518.
18. Green, A. R., Hayes, R. P., Xun, L. & Kang, C. (2012) Structural understanding of the glutathione-dependent reduction mechanism of glutathionyl-hydroquinone reductases, *J Biol Chem.* **287**, 35838-48.
19. Menand, B., Marechal-Drouard, L., Sakamoto, W., Dietrich, A. & Wintz, H. (1998) A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in *Arabidopsis thaliana*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **95**, 11014-9.
20. Meux, E., Morel, M., Lamant, T., Gerardin, P., Jacquot, J. P., Dumarcay, S. & Gelhaye, E. (2013) New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases, *Biochimie.* **95**, 336-46.
21. Nickerson, W. J., Falcone, G. & Strauss, G. (1963) Studies on Quinone-Thioethers. I. Mechanism of Formation and Properties of Thiodione, *Biochemistry.* **2**, 537-43.
22. Vince, R., Daluge, S. & Wadd, W. B. (1971) Studies on the inhibition of glyoxalase I by S-substituted glutathiones, *Journal of medicinal chemistry.* **14**, 402-4.
23. van Ommen, B., Ploemen, J. H., Bogaards, J. J., Monks, T. J., Gau, S. S. & van Bladeren, P. J. (1991) Irreversible inhibition of rat glutathione S-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. Structure-activity relationship and mechanism, *Biochem J.* **276 (Pt 3)**, 661-6.
24. Cuff, M. E., Marshall, N., Cobb, G. & Joachimiak, A. (2010) The structure of a putative glutathione S-transferase from *Corynebacterium glutamicum*, *Midwest Center for Structural Genomics. Protein Structure Initiative*.
25. Kim, J., Toro, R., Bhosle, R., Al Obaidi, N. F., Morisco, L. L., Wasserman, S. R., Sojitra, S., Attonito, J. D., Scott Glenn, A., Chowdhury, S., Evans, B., Hillerich, B., Love, J., Seidel, R. D., Imker, H. J., Gerlt, J. A. & Almo, S. C. (2014) Crystal structure of a glutathione transferase from *Gordonia bronchialis* DSM 43247, target EFI-507405, *Enzyme Function Initiative*.
26. Dixon, D. P. & Edwards, R. (2010) Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing, *J Biol Chem.* **285**, 36322-9.

Tables

Table 1. *Statistics of X-ray diffraction data collection and model refinement.*

Table 2. *Kinetic parameters of Pt-GHR1.*

Catalytic parameters were determined using varying substrate concentrations at saturating GSH concentration by fitting the results to the Michaelis-Menten equation using GraphPad Prism 5 software. Data are represented as mean ± S.D (n = 3). ND: not detected.

Table 3. *Kinetic parameters of GHRs towards menadione-SG and menadiol-SG.*

Menadiol-SG was obtained from the reduction of menadione-SG by $NaBH_4$. Kinetics parameters were determined using varying substrate concentrations at saturating GSH concentration by fitting the results to the Michaelis-Menten equation using GraphPad Prism 5 software. Data are represented as mean ± S.D (n = 3). ND: not detected.

Figure legends

Figure 1. *Subcellular localization of Pt-GHRs.*

GFP fusions of Pt-GHR1 (A, C) and Pt-GHR2 (B, D) with (A, B) or without (C, D) targeting sequences were expressed in *Nicotiana benthamiana* young leaves. 1, visible light; 2, fluorescence of the construct (green); 3, autofluorescence of chlorophyll (red) and 4, merged images.

Figure 2. *Expression of Pt-GHR genes* in selected poplar organs.

Transcript levels were analyzed by RT-PCR after 25, 30 or 35 PCR cycles in stamens (St), male (Fl♂) and female (Fl♀) flowers, fruits (Fr), petioles (Pe), roots (Ro), leaves (Le) and buds (Bu). Ubiquitin was used as a housekeeping reference gene.

Figure 3. *3D structure of Pt-GHR1 in complex with glutathione.*

A. Cartoon representation of the overall structure of the dimeric Pt-GHR1. The N- and C-terminal domains are shown in cyan and magenta, respectively, and glutathione (GSH) as sticks. The secondary structures are labeled.

B. Glutathione binding site of Pt-GHR1. The catalytic cysteine (Cys49) and the residues involved in polar non-covalent interactions between the protein and GSH are represented as sticks. The putative polar interactions are shown as dashed lines.

C. Structure of the putative H-site in Pt-GHR1. The electrostatic surface (blue, positive charge; red, negative charge) of Pt-GHR1 in the region of GSH (shown as sticks) is superimposed with glutathionyl-menadione (sticks) bound in the active site of Ec-YqjG (PDB code: 4G0K) [18]. A cleft visible at the vicinity of the G-site could accommodate the non-glutathione moiety of the substrate. Residues delimiting this pocket are shown as sticks and labeled.

Figure 4. *Enzymatic reduction of menadione-SG and menadiol-SG by Pt-GHR1.*

A. UV/visible spectra (280-480 nm) of menadione-SG and menadiol-SG incubated with or without Pt-GHR1. Menadione (a) and menadione-SG (b) were incubated with $NaBH_4$, leading respectively to menadiol (c) and menadiol-SG (d). Deglutathionylation of menadione-SG into menadione (e) or of menadiol-SG into menadiol (f) by recombinant Pt-GHR1 in the presence of GSH. The addition of GSH alone has no effect.

B. Deglutathionylation of menadione-SG by Pt-GHR1 and Pt-GHR1 C49S. After 2 min incubation of menadione-SG with glutathione, the activity was recorded by adding recombinant enzymes and following the decrease of absorbance at 430 nm.

Table 1

	Pt-GHR1
Data collection	
Beam line	PX1, SOLEIL
Space group	$P2_12_12$
Nb of monomers in the ASU [a]	1
Cell dimensions a, b, c (Å)	36.53, 92.41, 86.90
Resolution (Å)	19.66-2.50 (2.64-2.50) [b]
Rmerge	0.16 (0.79)
Mean I/σ (I)	12.1 (3.0)
Completeness (%)	99.6 (82.1)
n observations	115,601 (16,767)
Redundancy	10.8 (10.9)
Wilson B factor (Å^2)	36
Phasing method [c]	**MR**
Refinement	
Resolution (Å)	19.50-2.50 (2.75-2.50)
n reflections	10,702 (2,479)
Cutoff	$F > 0\sigma(F)$
R_{all} (%) [d]	18.6
R_{free} (%) [d]	23.3 (31.1)
Average B-factor (Å^2)	
Protein atoms	40
Ligand atoms	48
Solvent atoms	34
Ramachandran statistics (%)	
Preferred regions	97.4
Allowed regions	2.6
Outlier residues	0.0
R.m.s.[e] deviations	
Bond length (Å)	0.003
Bond angle (°)	0.67

[a] ASU: Asymmetric unit.
[b] Values in parentheses are for highest resolution shell.
[c] MR: Molecular Replacement.
[d] R_{all} was determined from all the reflections (working set + test set), whereas R_{free} corresponds to a subset of reflections (test set).
[e] R.m.s.: Root mean square.

Table 2

	HED	DHA	Q-SG	BQ-SG $_{309\ nm}$	ClBQ-SG $_{318\ nm}$
K_m (µM)					
Pt-GHR1	400.00 ± 40.00	770.00 ± 70.00	2.68 ± 0.26	92.59 ± 16.94	71.96 ± 8.60
Pt-GHR1 C49S	80.00 ± 10.00	nd	nd	nd	nd
Pt-GHR1 C49A	nd	nd	nd	nd	nd
k_{cat} (s^{-1})					
Pt-GHR1	29.40 ± 0.87	1.85 ± 0.07	0.013 ± 0.0004	1.62 ± 0.15	7.96 ± 0.33
Pt-GHR1 C49S	0.22 ± 0.01	nd	nd	nd	nd
Pt-GHR1 C49A	nd	nd	nd	nd	nd
k_{cat}/K_m ($M^{-1}.s^{-1}$)					
Pt-GHR1	$73.62x10^3 \pm 2.17x10^3$	$2.39x10^3 \pm 0.10x10^3$	$4.95x10^3 \pm 0.16x10^3$	$17.50x10^3 \pm 1.58x10^3$	$110.60x10^3 \pm 4.52x10^3$
Pt-GHR1 C49S	$2.74x10^3 \pm 0.07x10^3$	nd	nd	nd	nd
Pt-GHR1 C49A	nd	nd	nd	nd	nd

Table 3

	Menadione-SG	Menadiol-SG
K_m (mM)		
Pt-GHR1	0.27 ± 0.00	0.003 ± 0.001
Pc-GHR1	2.00 ± 0.62	0.007 ± 0.001
Ec-YqjG	1.20 ± 0.30	0.025 ± 0.003
k_{cat} (s^{-1})		
Pt-GHR1	4.75 ± 0.30	9.42 ± 0.57
Pc-GHR1	19.60 ± 2.30	27.90 ± 1.07
Ec-YqjG	23.80 ± 1.90	40.98 ± 0.90
k_{cat}/K_m ($M^{-1}.s^{-1}$)		
Pt-GHR1	$17.37x10^3 \pm 1.10x10^3$	$3215.10x10^3 \pm 192.47x10^3$
Pc-GHR1	$9.80x10^3 \pm 0.32x10^3$	$4019.25x10^3 \pm 154.05x10^3$
Ec-YqjG	$19.20x10^3 \pm 0.33x10^3$	$1659.03x10^3 \pm 36.53x10^3$

Figure 1

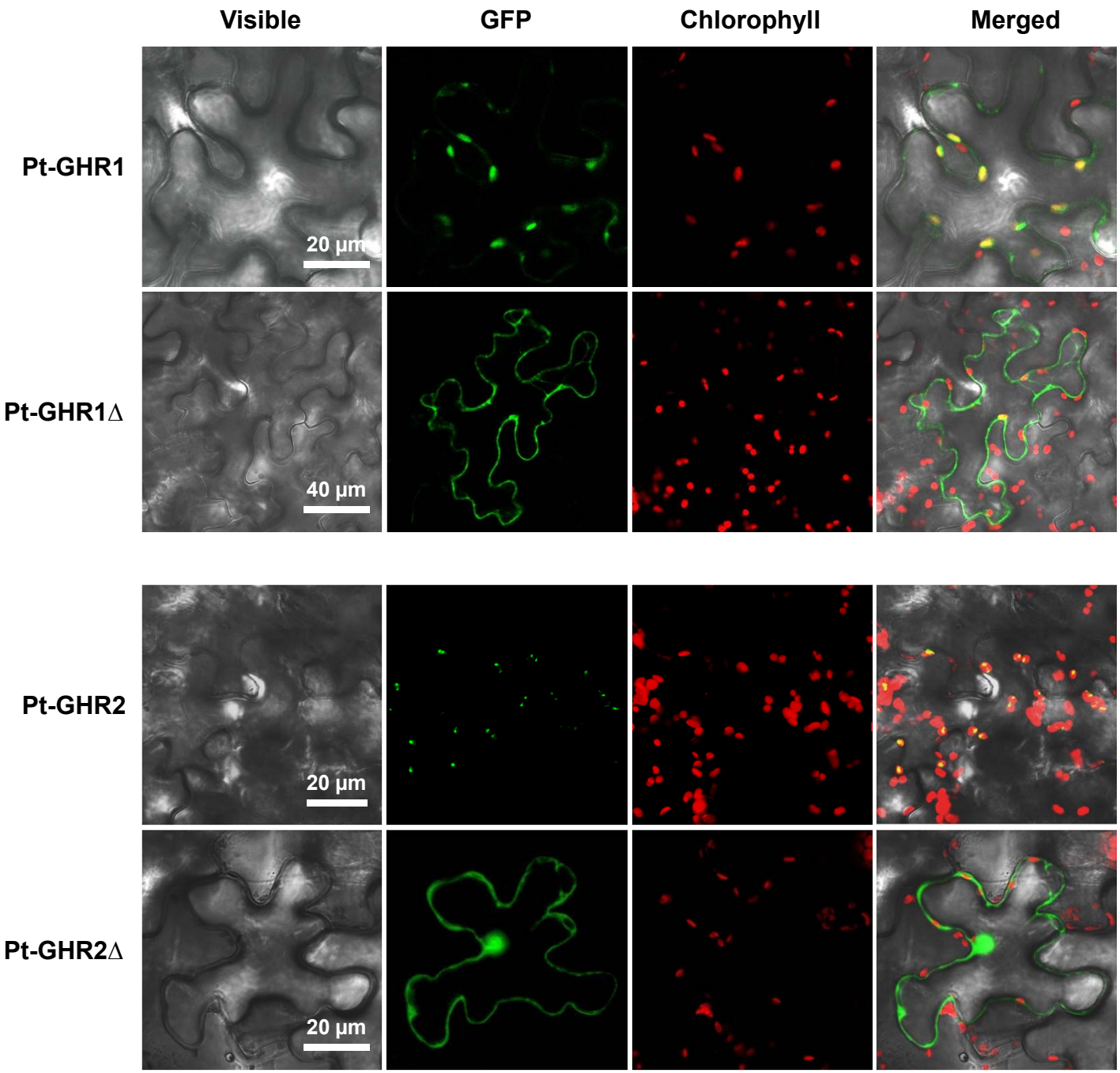

Visible
GFP
Chlorophyll
Merged
Pt-GHR1
20 µm
Pt-GHR1Δ
40 µm
Pt-GHR2
20 µm
Pt-GHR2Δ
20 µm

Figure 2

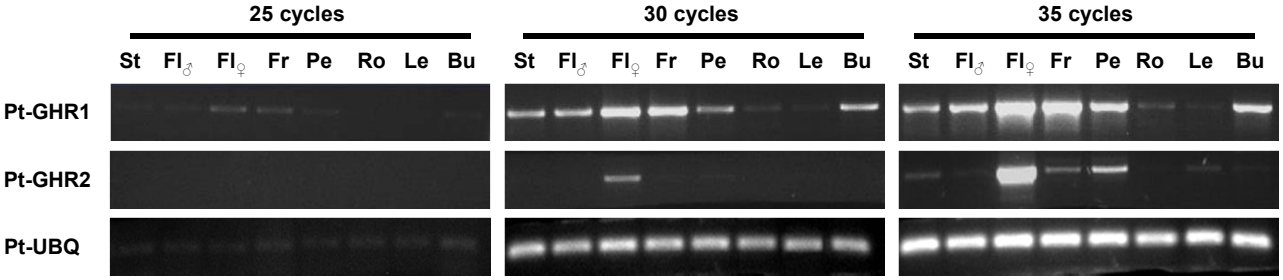

25 cycles
30 cycles
35 cycles
St
Fl♂
Fl♀
Fr
Pe
Ro
Le
Bu
Pt-GHR1
Pt-GHR2
Pt-UBQ

Figure 3

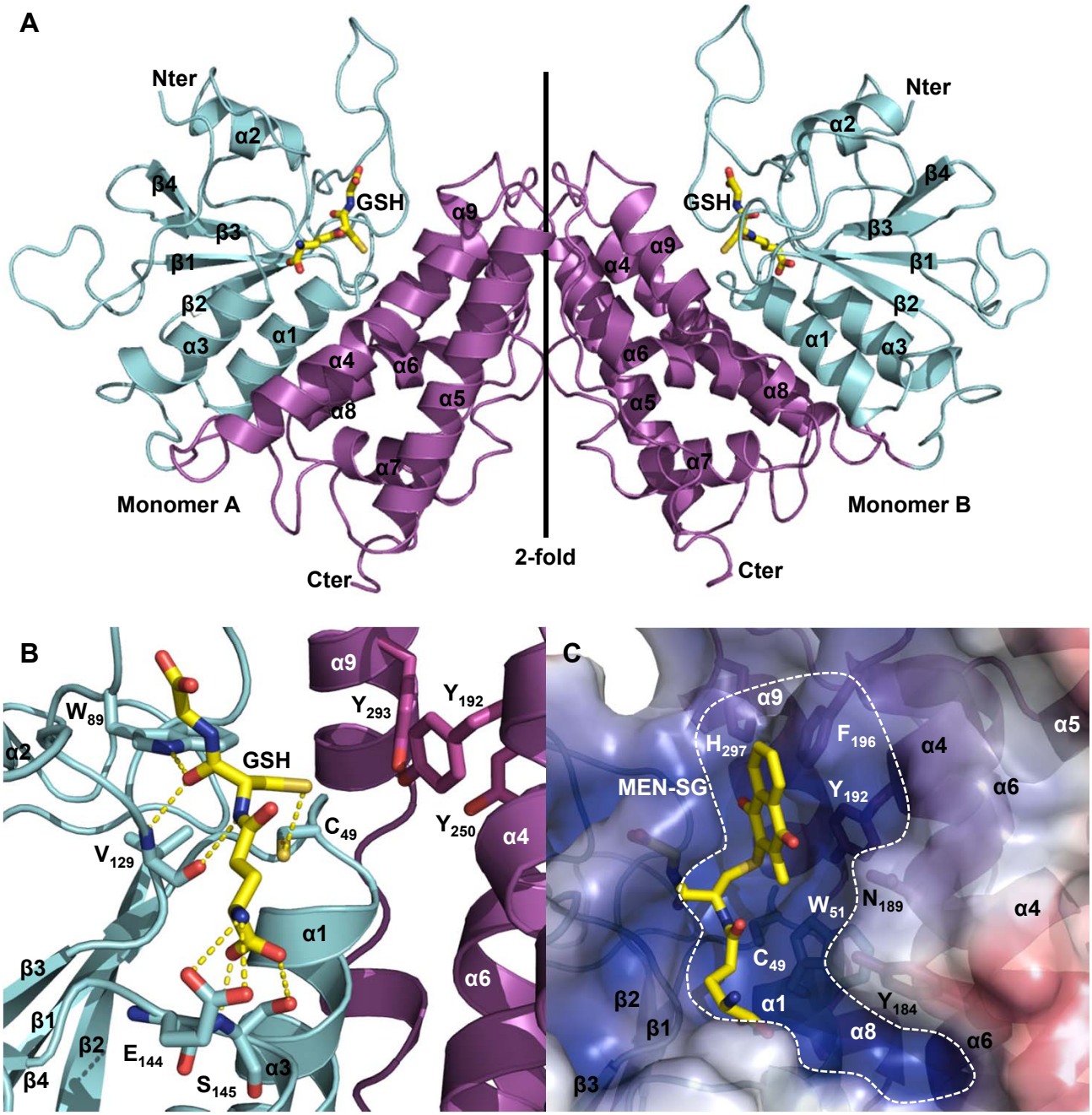
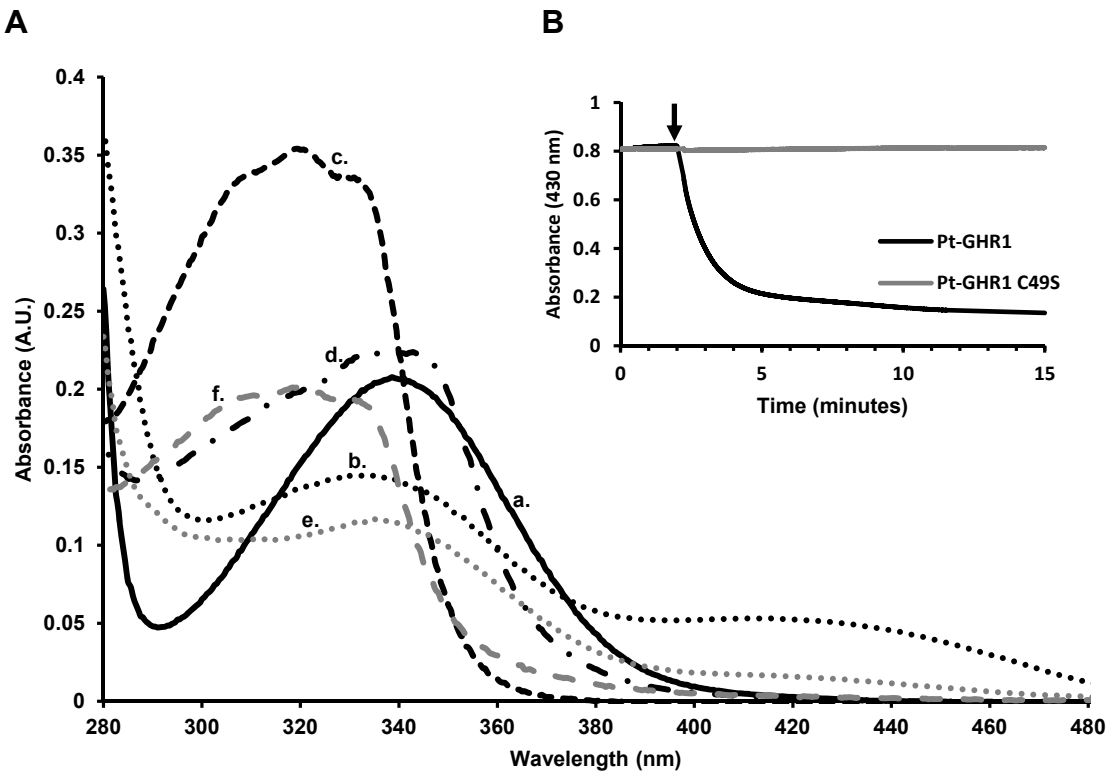

A
Nter
α2
β4
GSH
α9
β3
β1
β2
α1
α3
α4
α6
α8
α5
α7
Monomer A
Cter
2-fold
Nter
α2
β4
GSH
α9
β3
α4
β1
β2
α1
α3
α6
α8
α5
α7
Monomer B
Cter
B
α9
W89
Y293
Y192
α2
GSH
C49
Y250
α4
V129
α1
β3
α6
β1
β2
E144
α3
β4
S145
C
α9
α5
H297
F196
α4
MEN-SG
Y192
α6
W51
N189
α4
C49
β2
α1
Y184
β1
α8
α6
β3

Figure 4


A
B
Absorbance (A.U.)
Wavelength (nm)
a.
b.
c.
d.
e.
f.
Absorbance (430 nm)
Time (minutes)
Pt-GHR1
Pt-GHR1 C49S

Supplementary Material

Materials and Methods

Crystallization and structure determination of recombinant Pt-GHR1.

Initial screening of crystallization conditions was carried out by the vapour diffusion method with a Mosquito^{TM} nanoliter-dispensing system (TTP Labtech). Sitting drops were set up using 400 nl of a 1:1 mixture of protein and crystallization solutions (672 different commercially available conditions) equilibrated against 150 µl reservoir in multiwell plates (Greiner Bio-One). The crystallization plates were stored at 18°C in a RockImager1000^{TM} (Formulatrix) automated imaging system to monitor crystal growth. Manual optimization was performed in Limbro plates by the hanging-drop method. The best crystals were obtained by mixing 1.5 µl of Pt-GHR1 protein at 15 mg.ml^{-1} with 1.5 µl reservoir solution of 1.8 M ammonium chloride, 10 mM cobalte chloride and 100 mM MES pH 6.5.

Single crystals of Pt-GHR1 were flash-cooled in liquid nitrogen using a mixture of 50% paratone-N and 50% paraffin oil as cryoprotectant. Pt-GHR1 X-ray diffraction data were collected on beamline PROXIMA-1 at synchrotron SOLEIL (St Aubin, France). The diffraction images were integrated with the program XDS (Kabsch, 2010) and crystallographic calculations were carried out with programs from the CCP4 program suite (Winn et al., 2011).

The structure of Pt-GHR1 was solved by the molecular replacement method with the program Molrep (Vagin and Teplyakov, 2010) using a monomer of the GHR from *Phanerochaete chrysosporium* as template (PDB code: 3PPU). The structures were refined by alternate cycles of restrained maximum-likelihood refinement with the program Phenix (Adams et al., 2010) and manual adjustments were made to the models with Coot (Emsley et al., 2010). The crystal parameters, data statistics, and final refinement parameters are shown in Table 1. All structural figures were generated with PyMol.

References

Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66:213-221.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66:486-501.

Kabsch, W. (2010). Xds. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66:125-132.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. J Appl Crystallogr 40:658-674.

Vagin, A., and Teplyakov, A. (2010). Molecular replacement with MOLREP. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66:22-25.

Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., et al. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 67:235-242.

Figures and Tables

```
                 ....|....| ....|....|                                        ... .|....|...
                     5          15                                                25
Pt-GHR1          MARSAIDETS DTGAFKRTAS ---------- ---------- ---------- -------TFR NFISKEPNSQ 33
Pt-GHR2          MSQLAPSDSS GRYTRPASKF ---------- ---------- ---------- ---------- ----RLNPPF 26
Pc-GHR1          MSFTTGSTLQ HQEAQLQGAK DETVTQLEQR AAGGASHELQ SDISKMKTED DGSFKRKAAS FRNWIQPNGD 70
Ec-YqjG          MGQLIDGVWH DTWYDTKSTG GKFQRSAS-- ---------- ---------- -AFRNWLTAD GAPGPTGTGG 47
Sc-PcpF          MGLLIDGVWR DAWYDTKSSG GRFVRKESQ- ---------- ---------- ---------- YRGGLD--AG 37
Cg-GSTX          SNAMANTSSD WAGAPQNASA DGEFVRDTN- ---------- -----YIDDR IVADVPAGSE PIAQEDGTFH 51
Gb-GSTX          MAPDTHSSDS EQGSYVTTG- -QEFVRDTKY ---------- ---------- --------IE TRITADGRDG 40
Hs-GSTO1-1       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----MSGESA RSLGKGSAPP 16
Pt-GSTL3         ---------- ---------- ---------- ---------- -----MATAS ALDKSVPEKL APPLDATAEQ 25

                          β1          α1          β2
                 .|....|... .|....|... .|....|... .|....|.... |....|... .|....|... .|....|.
                  35         45         55         65         75         85         95
Pt-GHR1          FPPESGRYHL YVSYACPWAS RCLAYLKIKG LEKAIAFTSV KPIWERTKES DEHMGWVFPA SETEEAGA-- 101
Pt-GHR2          TLQNSTTLHL YVGLPCPWAH RTLIVRALKG LEDAVPVSIA GPGQDG---- ----SWEFKD IPISNRDRNI  88
Pc-GHR1          FTPEKGRYHL YVSYACPWAT RTLIVRKLKG LEDFIGVTVV SPRMGSN--- ----GWPFAN VDPFPAAD-- 131
Ec-YqjG          FIAEKDRYHL YVSLACPWAH RTLIMRKLKG LEPFISVSVV NPLMLEN--- ----GWTFDD S--FPGAT-- 106
Sc-PcpF          FRGEPGRYHL YAGFACPWAH RVLIMRALKG LEEMISVSMV NAYMGEN--- ----GWTFLP G--------- 91
Cg-GSTX          WPVEAGRYRL VAARACPWAH RTVITRRLLG LENVISLGLT GPTHDVR--- ----SWTFDL DPN------- 110
Gb-GSTX          YPVEPGRYRL IAARACPWAN RTLIVRRLLG LENVLSLGLC GPTHDKN--- ----SWTFDL DPG------- 96
Hs-GSTO1-1       GPVPEGSIRI YSMRFCPFAE RTRLVLKAKG IRHEVININL KNKP------ ---------- ---------- 60
Pt-GSTL3         PPLFDGTTKL YTCYTCPFAQ RVWITRNFKG LQDEIKLVPL ILQNRP---- ---------- ---------- 71
                                                                          $

                          α2          β3     β4     α3
                    ...|... .|....|... .|.. ..|.. ..|....|.. ..|....|.. ..|....|.. ..|..  ..|
                      105        115        125        135        145        155        165
Pt-GHR1          ---EPDTLNG ARSIRELYEL ASTN-YAGKY TVPVLWDKKL KTIVNNESSE IIRMFNTEFN DIAEN--AAL 165
Pt-GHR2          LVPGRDNANG CRNLKGVYGL RRSGGYSGRA TVPMLWDVEK KEVGCNESYD IIEFFNSGLN GLARN--PGL 156
Pc-GHR1          ----SDPLNN AQHVKDLYLK VKPD-YDGRF TVPVLWDKHT GTIVNNESSE IIRMFNTAFN HLLPEDKAKL 196
Ec-YqjG          ----GDTLYQ NEFLYQLYLH ADPH-YSGRV TVPVLWDKKN HTIVSNESAE IIRMFNTAFD ALGAK---AG 168
Sc-PcpF          DDVVPDSING ADYLYQVYTA ADPT-YTGRV TIPILWDKVE KRILNNESSE IIRILNSAFD DVGAL---PG 157
Cg-GSTX          ---HLDPVLQ IPRLQDAYFN RFPD-YPRGI TVPALVEESS KKVVTNDYPS ITIDFNLEWK QFHR--EGAP 174
Gb-GSTX          ---GVDPVLG IPRLKDAYEK RFPG-YPKGI TVPAVVEIAT GEVVTNDFPQ ITIDFSLEWT AYHR--DGAP 160
Hs-GSTO1-1       ---------- --EWFF KKN PF-------G LVPVLENSQ- -GQLIYESAI TCEYLDEAYP --------GK 100
Pt-GSTL3         ---------- --AWYPEKVY PP------N- KVPSLEHNG- --KITGESLD LIKYLESNFE --------GP 111
                                        $                   $$

                                α4                                α5
                 ...  .|... .|....|... .|....|... .|....|... .|....|... .|....|...    .|....|
                             175        185        195        205        215           225
Pt-GHR1          DLY--PSHLQ AQIDETNGWV YDGINNGVYK CGFARKQGPY EEAAIQLYEA LDKCEEILGR ---QRYICGN 230
Pt-GHR2          DLS--PKELK GKIGEWNGLI YPNVNNGVYR CGFAQSQDAY DSAVNGLFTT LEAVEDHLTT ---SRYLCGD 221
Pc-GHR1          DLY--PESLR AKIDEVNDWV YDTVNNGVYK SGFASTQKAY EAAVIPLFES LDRLEKMLEG ---QDYLIGG 261
Ec-YqjG          DYY--PPALQ TKIDELNGWI YDTVNNGVYK AGFATSQEAY DEAVAKVFES LARLEQILG- --QHRYLTGN 233
Sc-PcpF          DYY--PAEFR PEIDRINARV YETLNNGVYR SGFATTQEAY EEAFYPLFDT LDWLEEHLTG ---REWLVGD 222
Cg-GSTX          NLY--PAELR EEMAPVMKRI FTEVNNGVYR TGFAGSQEAH NEAYKRLWVA LDWLEDRLS- --TRRYLMGD 239
Gb-GSTX          QLY--PEHLR AEIDEVSKGI YTEVNNGVYR CGFAGSQDAY DAAYDRLFTK LDELSERLAQ ---QRYLVGD 225
Hs-GSTO1-1       KLLPDDPYEK ACQKMILELF SK-VPSLVGS FIRSQNKEDY AGLKEEFRKE FTKLEEVLTN -KKTTFFGGN 168
Pt-GSTL3         SLLPKDPAKK EFAEELFSYT DK-FNGTVYT A-------FK GDLAKEAGPA FDHLENALHK FDDGPFFLGK 173

                          α6                                α7     α8     α9
                 ....|....| ....|....| ....|....| .. ..|.... |....|. .. .|....|. . ..|....|..
                    235        245        255        265        275        285        295
Pt-GHR1          TLSEADIKLF VTLIRFDEVY AVHFKCNKKL LR-DYPNMFN YTKDIFQ-IP GMSSTVNM-Q HIKRHYYGSH 297
Pt-GHR2          TLTLADVCLF TTLIRFDIVY NVLFKCTKKK LI-EYPNLHG YMRDIYQMPK VAETCNFS-A IMDGYYKVLF 289
Pc-GHR1          QLTEADIRLF VTIVRFDPVY VTHFKCNLRT IRDGYPNLHR WMRKLYWGNP AFKDTCNF-E HIKTHYFWSH 330
Ec-YqjG          QLTEADIRLW TTLVRFDPVY VTHFKCDKHR IS-DYLNLYG FLRDIYQ-MP GIAETVNF-D HIRNHYFRSH 300
Sc-PcpF          RLTEADIRLF PTLVRFDAIY HGHFKCNLRR IA-DYPNLSR LVGKLAS-HE RVAPTINL-R HAKAHYYGSH 289
Cg-GSTX          HITEADIRLY PTLVRFDAVY HGHFKCGRNK IT-EMPNLWG YLRDLFQ-TP GFGDTTDF-T EIKQHYYITH 306
Gb-GSTX          TITEADVRLF TTLARFDAVY HGHFKCNRSK LS-EMPVLWA YARDLFQ-TP GFGDTTDF-T QIKQHYYIVH 292
Hs-GSTO1-1       SISMIDYLIW PWFERLEAMK LN------EC VD-HTPKLKL WMAAMKE-DP TVSALLTSEK DWQGFLELYL 230
Pt-GSTL3         EFSLVDIAYI PFVERLNIFL LEVFK--YDI TA-GRQKLAA WIEEVNK-IE AYKQTKTDPK ELVEFYKKRF 239

                 ..|....|.. ..|.. ..|. ...|....|. ...|....|. ...|....|. ...| ....|..
                      305        315        325        335        345        355
Pt-GHR1          PTVNPFGIIP LGPDI-DYSS PHDRNRFSS- ---------- ---------- ------- 324
Pt-GHR2          P-LNPGSICP VMPSGCEHDV LLSTPHNRES LSLANKTTKQ DH-------- ------- 329
Pc-GHR1          TFINPHRIVP IGPIP-DILP LDA------- ---------- ---------- ------- 351
Ec-YqjG          KTINPTGIIS IGPWQ-DLDE PHGRDVRFG- ---------- ---------- ------- 327
Sc-PcpF          PSVNPTGIVP VGPAQ-PLPG LTLQS----- ---------- ---------- ------- 312
Cg-GSTX          AEINPTRIVP VGPDLSGFAT PHGREKLGGS PFAEGVTLPG PIPAGEEVKN PEPFQK- 361
Gb-GSTX          SDINPTQIVP KGPDLRNWLT PHHREELGGR PFGDG-TPPG PPIAAEVVPA QNWVPTS 347
Hs-GSTO1-1       QNSPEACDYG L--------- ---------- ---------- ---------- ------- 240
Pt-GSTL3         LA-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------- 240
```

Figure S1. *Sequence alignment of Pt-GHR1 with GHR, GSTO and GSTL members*

The sequence alignment was generated with Expresso from the 3D-Coffee suite (http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/index.html) and manually adjusted using the structures of *Populus trichocarpa* Pt-GHR1, *Phanerochaete chrysosporium* Pc-GHR1 (PDB code: 3PPU), *Escherichia coli* Ec-YqjG (PDB code: 4G0I), *Sphingobium chlorophenolicum* Sc-PcpF (PDB code: 4FQU), *Corynebacterium glutamicum* Cg-GSTX (PDB code: 3M1G), *Gordonia bronchialis* Gb-GSTX (PDB code: 4PTS), *Homo sapiens* Hs-GSTO1-1 (PDB code: 1EEM) and *Populus trichocarpa* Pt-GSTL3 (PDB code: 4PQI) as templates. Secondary structures of Pt-GHR1 are labeled and represented as arrows (β-strands) and coils (α-helices). In each sequence selected, folded regions are highlighted in grey (β-strands) and yellow (helices). Residues conserved in GHR, GSTO and GSTL are coloured in white and highlighted in black. Conserved tyrosine residues, located in the H site of GHRs, are coloured in white and highlighted in red. The symbols $ indicate the residues which interact with glutathione as observed in the crystal structures of in the crystal structures of Pt-GHR1, Pc-GHR1, Ec-YqjG and ScPcpF.

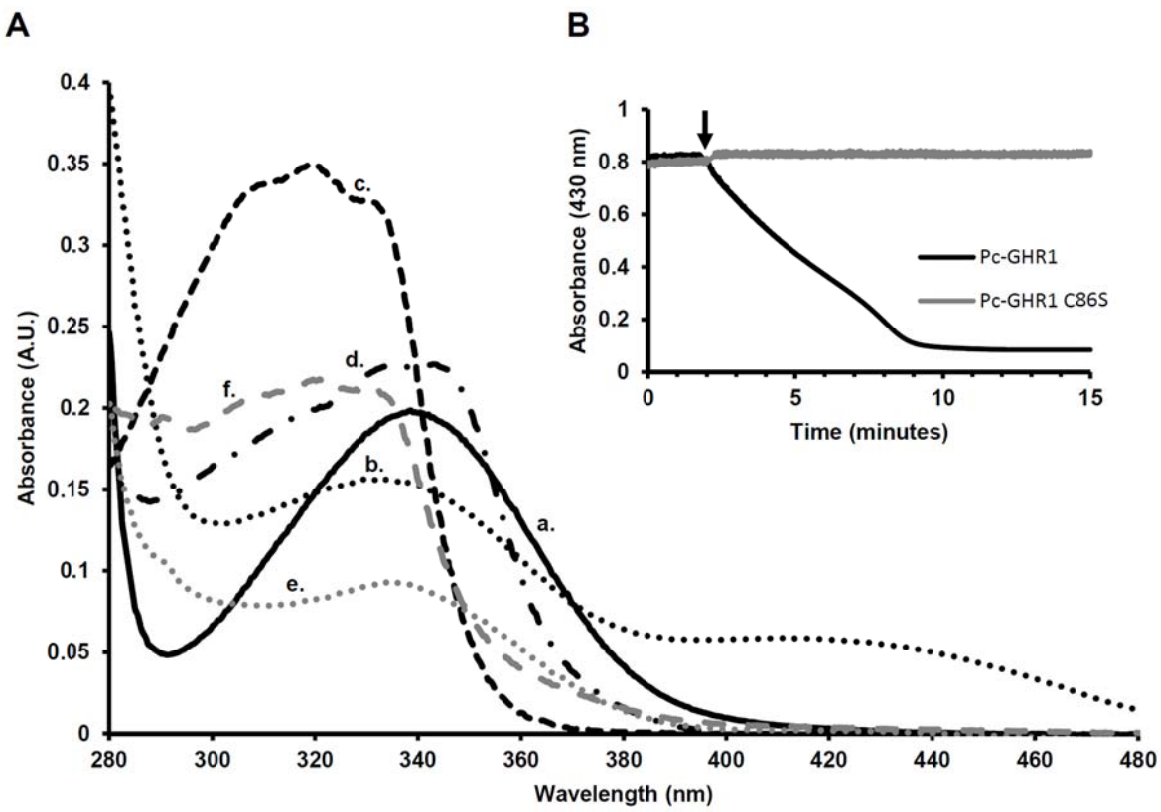


Figure S2. *Enzymatic reduction of menadione-SG and menadiol-SG by Pc-GHR1.*

A. UV/visible spectra (280-480 nm) of menadione-SG and menadiol-SG incubated with or without Pc-GHR1. Menadione (a) and menadione-SG (b) have been incubated with $NaBH_4$ leading respectively to menadiol (c) and menadiol-SG (d). After the addition of GSH (no effect was observed on the spectra), menadione-SG and menadiol-SG are respectively catalyzed by recombinant Pc-GHR1 into menadione (e) and menadiol (f).

B. Reduction of menadione-SG by Pc-GHR1. Activity was recorded by following the decrease of absorbance at 430 nm. Recombinant enzymes were added 2 min after the incubation of menadione-SG with glutathione.

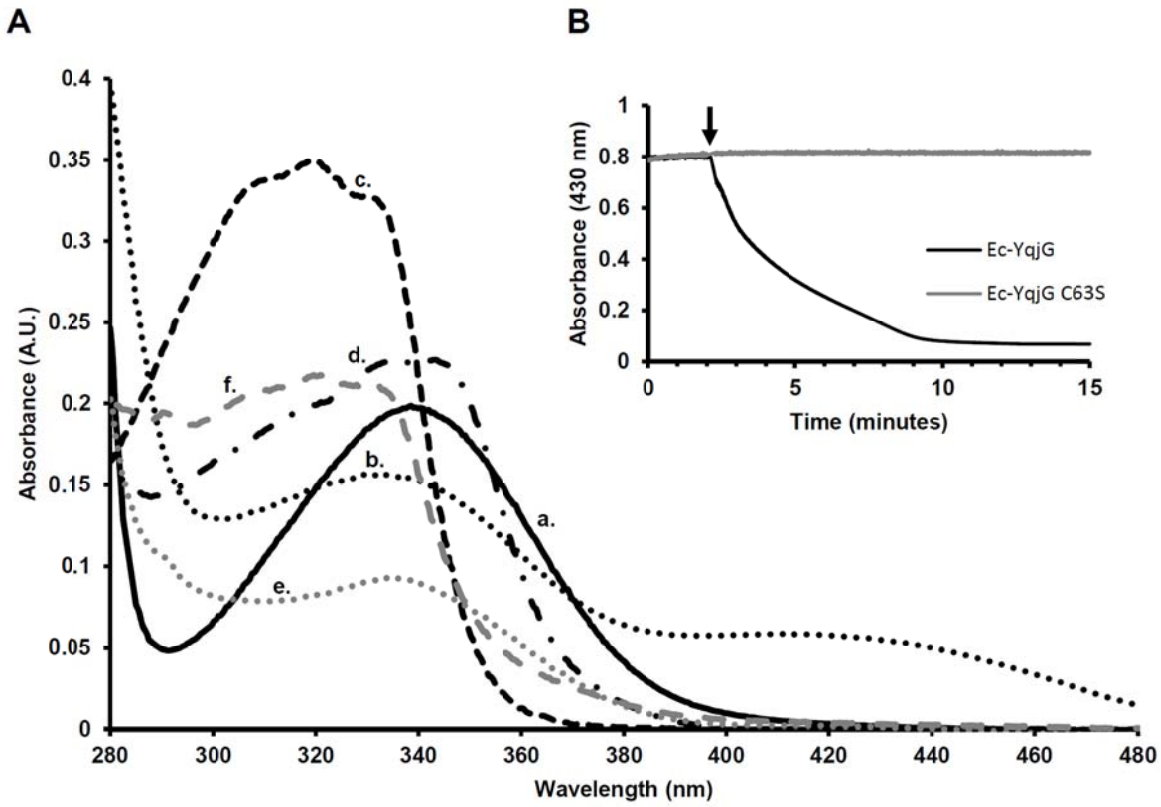


Figure S3. *Enzymatic reduction of menadione-SG and menadiol-SG by Ec-YqjG.*

A. UV/visible spectra (280-480 nm) of menadione-SG and menadiol-SG incubated with or without Ec-YqjG. Menadione (a) and menadione-SG (b) were incubated with $NaBH_4$ leading respectively to menadiol (c) and menadiol-SG (d). After the addition of GSH (no effect was observed on the spectra), menadione-SG and menadiol-SG are respectively catalyzed by recombinant Ec-YqjG into menadione (e) and menadiol (f).

B. Reduction of menadione-SG by Ec-YqjG. Activity was recorded by following the decrease of absorbance at 430 nm. Recombinant enzymes were added 2 min after the incubation of menadione-SG with glutathione.

Table S1. *Primers used in this study.*

Name	Sequence
Cloning in pCK-GFP vector	
Pt-GHR1 (*Potri.015G121600*)	
GHR1-*Bsp*HI-For1 (ATG1)	5′-ggggggggTCATGATTTGTGTGTTCACCAAAC
GHR1-*Nco*I-For2 (ATG2)	5′-ggggggggCCATGGCTCGATCTGCAATTGATG
GHR1-*Bam*HI-Rev	5′-ggggggggGGATCCGAAGAAAACCTGTTCCTGTCGTG
Pt-GHR2 (*Potri.014G192300*)	
GHR2-*Bbs*I-For1 (ATG1)	5′-ggggggggGAAGACACCATGTCCGGTGTATTACTCTTCAGC
GHR2-*Bbs*I-For2 (ATG2)	5′-ggggggggGAAGACACCATGTCCCAGCTCGCTCCCTCTG
GHR2-*Bam*HI-Rev	5′-ggggggggGGATCCTGATCCTGTTTGGTAGTTTTGTTC
Cloning in pET-28a vector	
Pt-GHR1 (*Potri.015G121600*)	
GHR1-*Nco*I-For2	5′-ggggggggCCATGGCTCGATCTGCAATTGATG
GHR1-*Not*I-Rev	5′-ggggggggGCGGCCGCCTATGAAGAAAACCTGTTCCTGTCG
Pt-GHR2 (*Potri.014G192300*)	
GHR2-*Bbs*I-For1	5′-ggggggggGAAGACACCATGTCCGGTGTATTACTCTTCAGC
GHR2-*Bbs*I-For2	5′-ggggggggGAAGACACCATGTCCCAGCTCGCTCCCTCTG
GHR2-*Bbs*I-For3 (MSTIT)	5′-ggggggggGAAGACGGCATGTCCACAATAACAAACCTATTGTGGGGCCAG
GHR2-*Bbs*I-For4 (MTNLL)	5′-ggggggggGAAGACGGCATGACAAACCTATTGTGGGGCCAGTCACTG
GHR2-*Not*I-Rev	5′-ggggggggGCGGCCGCTCAGTGATCCTGTTTGGTAGTTTTG
GHR2-*Not*I-His_6-Rev	5′-gggggGCGGCCGCTCAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATCCTGTTTGGTAGTTTTG
GHR2-*Not*I-StrepTagII-Rev	5′-gggggGCGGCCGCTCATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGTGATCCTGTTTGGTAGTTTTGTTCGC
Mutagenesis	
Pt-GHR1	
GHR1-C49S-For	5'-TTTATGTGTCCTATGCTAGTCCTTGGGCTTCTAGG
GHR1-C49S-Rev	5'-CCTAGAAGCCCAAGGACTAGCATAGGACACATAAA
GHR1-C49A-For	5'-AGGTATCATCTTTATGTGTCCTATGCTGCTCCTTGGGCTTCTA
GHR1-C49A-Rev	5'-TAGAAGCCCAAGGAGCAGCATAGGACACATAAAGATGATACCT
RT-PCR	
Pt-GHR1 (*Potri.015G121600*)	
GHR1-RT-For	5′-ATGGCTCGATCTGCAATTGATG
GHR1-RT-Rev	5′-CTATGAAGAAAACCTGTTCCTGTCG
Pt-GHR2 (*Potri.014G192300*)	
GHR2-RT-For	5′-ATGTCCGGTGTATTACTC
GHR2-RT-Rev	5′-TCAGTGATCCTGTTTGGT
Pt-UBQ (*Potri.015G013600*)	
UBQ-RT-For	5′-GCAGGGAAACAGTGAGGAAGG
UBQ-RT-Rev	5′-GCTCTGGACTCACGAGGACAG

Table S2. *Molecular masses and oligomerization states of Pt-GHR1 and Pt-GHR1 C49S*

The molecular masses of native and reduced recombinant proteins were determined by mass spectrometry. The oligomerization states were determined using a calibrated size exclusion chromatographic analysis.

Protein	Theoretical mass	Native	Reduced	FPLC
Pt-GHR1	37 136 Da	37 005.6 Da / 37 310.7 Da (+ 305 Da)	37 005.6 Da	76 650 Da (Dimer)
Pt-GHR1 C49S	37 120 Da	36 990.5 Da	36 990.5 Da	78 100 Da (Dimer)
Pt-GHR1 C49A	37 104 Da	36 973.5 Da	36 973.5 Da	77 500 Da (Dimer)

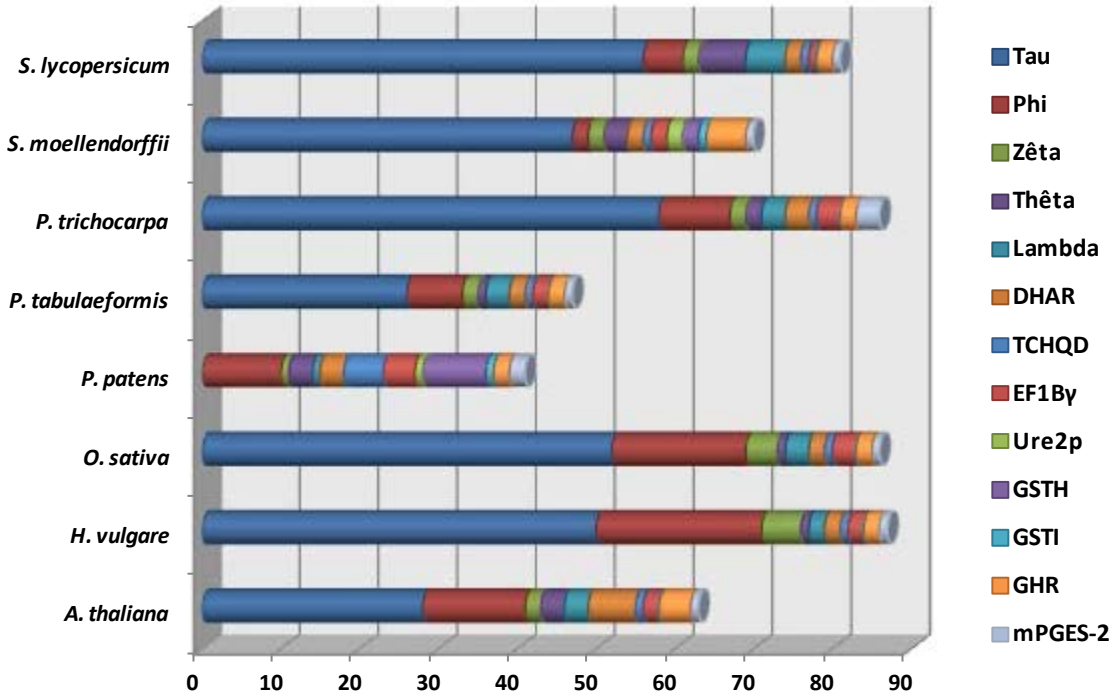
Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivaient dans un contexte plus global de caractérisation des relations structure - fonction de protéines appartenant à la superfamille des thiorédoxines et impliquées dans la régulation redox et la détoxication cellulaire. L'étude des GSTs a débuté au sein de l'équipe il y a quelques années en ciblant à la fois des GSTs d'origine fongique, constituant soit des classes spécifiques des champignons ou soit des classes fortement développées chez les organismes saprophytes et des GSTs d'origine végétale en se focalisant sur les GSTs à cystéine catalytique. Ce projet avait ainsi pour but de déterminer le rôle de ces protéines à travers une analyse fonctionnelle couplant des approches moléculaires, biochimiques et structurales. L'étude approfondie de ces classes de GSTs au sein des végétaux a ainsi mis en évidence des spécificités fonctionnelles et phylogénétiques permettant de mieux comprendre l'évolution adaptative de cette superfamille d'enzymes. Il est à noter, au risque d'être quelque peu redondant, qu'un certain nombre d'éléments de discussion sont déjà présentés dans les articles de recherche et surtout dans l'article n°1 qui inclut une synthèse récente de l'état des connaissances sur ces classes de Cys-GSTs. A l'inverse certains éléments ne seront pas rediscutés s'ils ne sont pas utiles pour la compréhension de cette discussion générale.

1. Caractéristiques de séquence, phylogénie et évolution des GSTs à cystéine catalytique

L'étude phylogénétique des GSTs de plantes réalisée avant ces travaux de thèse à partir des génomes de *P. trichocarpa* et *A. thaliana* avait permis d'identifier de nombreux gènes codants des GSTs, répartis le plus souvent en 6 classes différentes. Notre analyse de génomique comparée effectuée à partir d'un plus grand nombre de génomes d'organismes photosynthétiques a conduit à définir 14 classes de protéines présentant un motif structural GST et ainsi à compléter la classification actuelle. Aucune classe de GSTs à tyrosine catalytique n'a été identifiée, confirmant la divergence tardive de ces classes et leur présence exclusive chez les animaux. Les GSTs à sérine catalytique sont en revanche très représentées et constituent la majorité des GSTs de plantes (Figure 62).



	Tau	Phi	Zêta	Thêta	Lambda	DHAR	TCHQD	EF1Bγ	Ure2p	GSTH	GSTI	GHR	mPGES-2	Total
A. thaliana	28	13	2	3	3	6	1	2	0	0	0	4	1	63
H. vulgare	50	21	5	1	2	2	1	2	0	0	0	2	1	87
O. sativa	52	17	4	1	3	2	1	3	0	0	0	2	1	86
P. patens	0	10	1	3	1	3	5	4	1	8	1	2	2	41
P. tabulaeformis	26	7	2	1	3	2	1	2	0	0	0	2	1	47
P. trichocarpa	58	9	2	2	3	3	1	3	0	0	0	2	3	86
S. moellendorffii	47	2	2	3	0	2	1	2	2	2	1	5	1	70
S. lycopersicum	56	5	2	6	5	2	1	1	0	0	0	2	1	81

Figure 62 : Représentation du nombre d'isoformes de chaque classe de GST présente au sein de quelques organismes de la lignée verte.
La répartition au sein des différentes classes a été réalisée par identification des séquences au sein des génomes d'*Arabidopsis thaliana* (arabette des dames), *Hordeum vulgare* (orge commune), *Oryza sativa* (riz), *Physcomitrella patens* (mousse), *Pinus tabulaeformis* (pin), *Populus trichocarpa* (peuplier), *Selaginella moellendorffii* (sélaginelle), *Solanum lycopersicum* (tomate) couplée à des analyses phylogénétiques.

L'expansion est particulièrement visible chez les GSTs Tau et dans une moindre mesure chez les GSTs Phi, le nombre de gènes variant de 0 à près de 60 et entre 1 et près de 30 respectivement. Il est intéressant de noter que l'explosion de certaines classes correspond le plus souvent à celles qui sont spécifiques d'un règne ou embranchement, bien que ce ne soit pas vrai pour toutes les classes « règne-spécifique ». Etant donné que ces enzymes sont responsables de la détoxication cellulaire via la catalyse de réactions de glutathionylation de xénobiotiques, ces expansions pourraient être expliquées par des phénomènes d'adaptation des espèces à leur niche écologique.

Parmi l'ensemble des GSTs identifiées, six classes (GSTs Lambda, DHAR, GHR, mPGES2, Iota et Hemerythrin) regroupent des membres pour lesquels la signature du site

actif contient pour la plupart du temps la cystéine catalytique de l'ancêtre supposé de type Grx2. De fait, ces classes sont celles qui ont divergé le plus tôt au cours de l'évolution. Aucune GST n'appartient aux classes de GSTs dimériques Bêta et Oméga qui sont respectivement retrouvées chez les bactéries ou chez les mammifères, les insectes et les champignons. La distinction entre les 6 classes est clairement visible en combinant plusieurs critères que sont l'architecture et la taille des protéines et sous-jacent à ce dernier paramètre la présence d'insertions ou d'extensions, la nature des acides aminés interagissant avec le glutathion et la position relative du motif comprenant la cystéine catalytique (CP[F/Y]A pour les GSTLs, CPW[A/C] pour les GHRs, CPFC pour les mPGES2s, CPF[C/S] pour les DHARs, CP[F/Y]T pour les GSTHs, CPYC pour les GSTIs).

Au sein de la lignée verte et hormis quelques exceptions, les organismes dont le génome a été séquencé ne contiennent généralement qu'un à quatre représentants par classe (Figure 62). Les DHARs, GHRs et mPGES2s sont retrouvées chez la majorité des organismes, les GSTLs uniquement chez les plantes terrestres, les GSTI spécifiquement chez les algues, la mousse *Physcomitrella patens* et la bryophyte *Selaginella moellendorffii* et les GSTHs spécifiquement chez les mousses et bryophytes. Ces dernières semblent, en revanche, avoir été perdues lors de la divergence des spermaphytes (angiospermes et gymnospermes) suggérant qu'elles pourraient avoir des fonctions très précises et/ou être spécialisées dans le métabolisme de ce type d'organismes ou alors que ces fonctions sont assurées chez les spermaphytes par des Cys-GSTs d'autres classes. Bien que la fonction des GSTIs ne soit pas encore élucidée à l'heure actuelle, l'analyse phylogénétique montre qu'elles sont proches des DHARs ce qui suggère qu'elles pourraient avoir un ancêtre commun proche et une fonction similaire. Alors que les GHRs et mPGES2s sont présentes chez des organismes appartenant à plusieurs règnes, les autres classes sont exclusivement présentes chez les plantes. L'analyse des séquences en acides aminés des mPGES2s a montré qu'elles étaient fortement apparentées aux isoformes mammaliennes. Cependant, l'absence de prostaglandines chez les végétaux pose des questions sur leurs fonctions physiologiques car au moins 1 gène est systématiquement présent chez les organismes photosynthétiques. La présence des GHRs chez tous les organismes sauf les animaux interpelle également. Soit elles contribuent à une fonction qui n'est pas présente ou pas essentielle chez les animaux soit cette fonction est assurée par d'autres protéines. Des sous-groupes sont clairement identifiables pour les GHRs, GSTLs et DHARs. Pour ces 2 dernières classes, les sous-groupes correspondent à la présence ou non d'un adressage chloroplastique. Concernant les GSTLs, cet adressage est toujours

présent y compris dans l'unique représentant présent chez *P. patens* traduisant un rôle ancestral et fondamental des GSTLs dans le métabolisme chloroplastique. A l'inverse, la version chloroplastique des DHARs n'est pas présente tout au long de la lignée verte et semble plutôt provenir d'une adaptation/évolution présente chez certains organismes, peut être liée à un rôle accru de l'ascorbate dans les chloroplastes ou d'autres compartiments cellulaires chez certains organismes. Pour les GHRs, le sous-groupe principal regroupe des protéines avec un motif CPWA, alors que l'autre sous-groupe n'est présent que chez les algues et contient des protéines de site actif CPWC. La présence de cette deuxième cystéine est dans une position adéquate pour éventuellement permettre un mécanisme réactionnel différent (voir la section suivante).

L'ensemble de ces analyses de génomiques comparatives nous a permis de recenser de manière exhaustive les différentes classes de Cys-GSTs présentes au sein de la lignée verte, mais surtout d'évaluer leurs répartitions au sein des espèces. Couplés à l'analyse des propriétés biochimiques et structurales, ces éléments nous ont ainsi conduits à échafauder un modèle évolutif des GSTs apparues avant l'étape de substitution de la cystéine catalytique en sérine. Il est tentant de penser que les GHRs ont divergé très tôt et évolué indépendamment des autres Cys-GSTs, puisqu'elles sont présentes partout y compris chez les cyanobactéries et qu'elles possèdent une interface de dimérisation et une spécificité de substrats uniques (voir ci-dessous). Pour préciser plus finement l'événement à l'origine de l'émergence de cette classe, il serait intéressant de savoir si certaines GHRs sont monomériques. Les GSTLs et DHARs ont vraisemblablement aussi divergé assez tôt puisqu'elles sont monomériques, comme l'ancêtre supposé des GSTs. Dans ce cas de figure, certains organismes auraient perdu ces gènes puisque les GSTLs ne sont présentes que chez les plantes terrestres et les DHARs ne sont pas retrouvées chez les cyanobactéries et dans la famille des prasinophycées chez les algues. Le peu d'informations disponibles sur les propriétés des GSTIs et GSTHs associé à la répartition très ciblée de ces gènes/protéines rendent les choses difficiles à interpréter. Le fait que les GSTIs soit phylogénétiquement proches des DHARs, possèdent une signature CPYC réminiscente des glutarédoxines et qu'elles soient retrouvées chez les algues vertes et les plantes terrestres « inférieures » suggèrent fortement qu'elles ont divergé assez tôt par insertion de certaines séquences (les GSTIs font autour de 500 acides aminés, les DHARs autour de 220). Elles auraient été perdues au moment du passage des ptéridophytes vers les spermaphytes. Le cas des GSTHs est aussi délicat à interpréter mais ces gènes semblent résulter d'un événement de fusion entre un gène codant une Cys-GST et un gène

codant le domaine hémérythrine trouvé du côté C-terminal de la protéine. Cet événement se serait produit assez tardivement puisque ces gènes/protéines ne sont présents que chez les bryophytes et ptéridophytes. Ils auraient ainsi été perdus par la suite au moment de la séparation vers les spermaphytes. Ne sachant pas si ces protéines sont monomériques ou dimériques, elles ont été placées hypothétiquement aux 2 endroits sur le modèle évolutif (Figure 63).

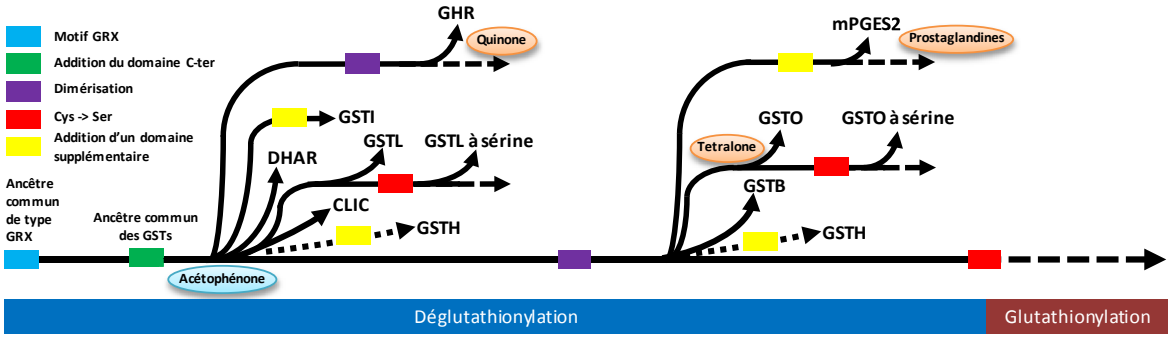


Figure 63 : Modèle évolutif des Cys-GSTs.
A la lumière des données récentes acquises, le modèle évolutif des Cys-GSTs a été actualisé à partir du modèle général décrit précédemment (REF). Les protéines monomériques (CLICs, DHARs, GSTLs) sont distinguées des Cys-GSTs à dimérisation classique (GSTBs, GSTOs). Les GSTIs, proches des DHARs, possèdent un site actif (CPYC) similaire à celui trouvé chez l'ancêtre supposé. Elles ont donc été considérées comme des protéines monomériques mais cela reste à confirmer expérimentalement. Bien que dimériques, il est proposé que les GHRs ont divergé assez tôt au cours de l'évolution car elles sont présentes chez toutes les espèces de la lignée verte, et les cyanobactéries et elles sont les seules à avoir ce type d'interface dimérique. Les mPGES2s ont a priori divergé après l'étape de dimérisation classique par insertion d'une séquence supplémentaire. Les GSTHs ont vraisemblablement évolué plus récemment par addition d'un domaine protéique de type hémérythrine dans certaines familles (bryophyte et ptéridophyte). Comme l'état d'oligomérisation des GSTHs est inconnu, ces dernières ont été positionnées comme GSTs mono- et dimériques et représentées en pointillés. L'analyse génomique a révélé que dans certaines classes (GSTLs et GSTOs), certains gènes codent des isoformes pour lesquelles la cystéine catalytique est remplacée par une sérine.

Les mPGES2s présentent un domaine d'ancrage dans les membranes ainsi qu'un mode de dimérisation semblable à celui des GSTs dimériques classiques mais qui se fait par l'intermédiaire de structures secondaires additionnelles (2 hélices α et 2 brins β) interagissant avec celles de l'autre monomère. Cependant, cette insertion semble être spécifique aux vertébrés et est absente chez les organismes photosynthétiques, ce qui suggère une organisation différente pour les mPGES2 végétales. Ces gènes/protéines semblent donc avoir divergé avec le processus principal de dimérisation par insertion de séquences. Concernant les familles de Cys-GSTs non présentes chez les plantes, les CLICs, tout du moins les versions solubles monomériques, ont divergé assez tôt par insertion d'une séquence entre les hélices α5 et α6, alors que les GSTOs et GSTBs ont vraisemblablement divergé après l'événement de dimérisation. Le fait que les GSTLs présentent un site actif (CPYA) une

structure et une spécificité de substrats très proches de celles des GSTOs pourrait expliquer que les organismes ne possèdent que l'une ou l'autre des protéines (GSTLs chez les plantes et GSTOs chez les champignons, insectes et mammifères). Le cas des GSTBs est particulier puisqu'elles ne sont trouvées que chez certaines bactéries et possèdent une interface de dimérisation certes classique mais plutôt de nature hydrophile. Il est extrêmement intéressant de noter par ailleurs que l'évolution a conduit à l'apparition, probablement de manière indépendante, de GSTLs et GSTOs possédant une sérine au lieu de la cystéine. Pour des GSTOs de champignon, ce changement concorde comme attendu avec l'acquisition d'une activité de glutathionylation et la perte de l'activité de déglutathionylation (Aurélie Deroy, Mélanie Morel-Rouhier, Eric Gelhaye, communication personnelle). En résumé, l'histoire évolutive des GSTs, notamment les Cys-GSTs, est extrêmement complexe. L'affinement du modèle nécessitera d'analyser un plus grand nombre de génomes et d'acquérir des connaissances supplémentaires sur les propriétés biochimiques et structurales d'une plus grande variété de représentants.

2. Propriétés biochimiques et structurales des Cys-GSTs de peuplier

Au démarrage de cette thèse, il existait assez peu de données biochimiques sur les GSTLs, GHRs et DHARs (Dixon, Davis et al. 2002; Dixon and Edwards 2010) et aucune donnée structurale. Nous avons ainsi publié ou sommes en voie de publier les premières structures de GSTLs et GHRs issues de plantes. Dans le cas des GHRs, des structures d'enzymes bactériennes (YqjG d'*E. coli* et PcpF de *Sphingobium chlorophenolicum)* et fongiques (GHRs de *Phnaerochaete chrysosporium*) ont été publiées dans l'intervalle (Meux, Prosper et al. 2011; Green, Hayes et al. 2012). Ceci a été possible grâce à la production de grande quantité de protéines recombinantes. Alors que les 4 versions de DHARs et GSTLs (si on inclut tous les variants identifiés à partir des 3 gènes) ont pu être produites et purifiées sans difficulté, des problèmes de solubilité ont été rencontrés pour les autres protéines (GHR1, GHR2 et mPGES2.1). Si PtGHR1 a finalement été purifiée à homogénéité et cristallisée, il s'est avéré que PtGHR2 était systématiquement insoluble ou agrégée malgré l'utilisation de différentes constructions, souches bactériennes et protocoles de production et purification. De la même manière, les multiples constructions réalisées pour la production de la protéine mPGES2, dépourvue de son domaine d'ancrage membranaire, n'ont pas permis d'obtenir une protéine soluble. A l'heure actuelle, aucune structure de DHAR n'a été résolue,

bien qu'un article décrivant l'obtention de cristaux pour une isoforme de riz ait été publié récemment (Do, Kim et al. 2014). De notre côté, nous avons longtemps essayé de cristalliser l'une des DHARs de peuplier mais sans succès. Puisque la protéine est monomérique et possède une taille encore acceptable, nous avons effectué des expériences par RMN en collaboration avec le Dr Pascale Tsan (CRM2, Université de Lorraine). A l'heure actuelle, l'attribution des résidus à partir d'échantillons marqués au C^{13} et N^{15} est achevée et des expériences d'interaction avec le substrat, le DHA, ont permis de définir les résidus importants pour l'interaction. L'autre volet que j'aimerais finaliser concernant les DHARs de peuplier avant de publier ces données est d'approfondir le mécanisme réactionnel utilisé par les différentes isoformes puisque la DHAR3 possède un site actif de type CPFS alors que les DHAR2 et 4 possèdent un site actif CPFC. Ces variations font penser à celles trouvées pour la famille des glutarédoxines qui possèdent également des sites actifs dits monothiol ou dithiol. Les questions sous-jacentes concernent ainsi le rôle de cette seconde cystéine et si elle contribue notamment à la formation d'un intermédiaire réactionnel sous la forme d'un pont disulfure dans certaines conditions. Pour les glutarédoxines, il a été suggéré que la seconde cysteine contribue à la reconnaissance du GSH qui est nécessaire pour l'étape de réduction de l'adduit glutathion formé sur les Grxs lors de l'étape initiale de déglutathionylation du substrat (Saaranen, Salo et al. 2009). La formation de ce pont disulfure a été observée pour la DHAR3 chloroplastique d'*A. thaliana* (Dixon, Davis et al. 2002) et un traitement prolongé de la DHAR2 de peuplier en présence de GSSG conduit à cet état redox plutôt qu'à une forme glutathionylée (données non présentées). A l'inverse, les DHAR monothiol cytosoliques d'*A. thaliana* sont isolées avec un adduit glutathion après traitement avec du GSSG (Dixon, Davis et al. 2002) ou avec un mélange H_2O_2 et GSH (Waszczak, Akter et al. 2014). Dans cette étude, il a également été montré que cet intermédiaire passe par la formation d'un acide sulfénique mais aussi que selon les conditions, un pont disulfure entre la cystéine catalytique et une cystéine située à proximité de l'extrémité N-terminale et partiellement conservée, ou des formes de suroxydation de la cystéine catalytique (acides sulfiniques ou sulfoniques) peuvent être formées (Waszczak, Akter et al. 2014). Il a ainsi été proposé que la formation de ces ponts disulfures pourrait représenter des mécanismes de protection contre la suroxydation. Toutefois, ceci reste à être confirmé car il faudrait que la protéine se retrouve dans des conditions de production intense en H_2O_2 et en présence de concentrations en glutathion réduit très fortement diminuées. Une dernière évidence qui plaide toutefois en faveur de l'importance de ce(s) pont(s) disulfure est que les DHARs ont été identifiées comme cibles de thiorédoxines dans plusieurs études protéomiques effectuées

à partir de plantes différentes (Wong, Balmer et al. 2003; Marchand, Le Marechal et al. 2004; Wong, Cai et al. 2004; Marchand, Le Marechal et al. 2006; Hagglund, Bunkenborg et al. 2008). Pour finir sur cet aspect, il est intéressant de noter qu'une DHAR de pomme de terre a également été identifiée comme étant nitrosylée en réponse à des traitements de tubercule et de feuilles avec du GSNO (Kato, Takemoto et al. 2013). Globalement, toutes les questions sur le type et le rôle des modifications redox des DHARs seront abordées en effectuant différents sortes de traitements oxydants avec H_2O_2, DTT oxydé, GSSG, GSNO et un donneur de NO, le DEA-NONOate sur les DHAR2 et 4 sauvages et les mutants cystéiniques qui sont déjà purifiés. Les effets seront analysés à la fois par des études de spectrométrie de masse mais aussi par des mesures d'activité en présence de différents systèmes de régénération. Le même genre de réflexions sur la contribution de la deuxième cystéine du site actif pour le mécanisme catalytique s'applique aux mPGES2 (sites actifs CPFC) et aux GHRs présentant un site CPWC.

Pour les protéines ne possédant que la seule cystéine catalytique, la question ne se pose a priori pas. Un mécanisme catalytique commun peut donc être proposé pour l'ensemble de ces Cys-GSTs. Le groupement thiol de ces cystéines se trouve normalement sous forme thiolate à pH physiologique (sauf peut être dans le compartiment apoplastique où le pH est acide) et effectue une attaque nucléophile sur le substrat. Le produit réactionnel est libéré mais la protéine devient glutathionylée avant qu'une deuxième molécule de GSH ne réduise finalement cet adduit. Ce mécanisme est étayé par le fait que les GSTLs et la GHR1 de peuplier sont purifiées au moins partiellement avec du glutathion lié covalemment sur la cystéine catalytique. Il était par contre plus surprenant que cela ne soit pas le cas pour la DHAR3 qui possède un site CPFS. Ceci pourrait être lié au fait qu'*E. coli* ne synthétise pas d'ascorbate et donc que la protéine n'a pas été en présence de substrats lors de la production et de la purification. L'utilisation de substrats modèles (HED, DHA) indique que les GSTLs, GSTOs, GHRs, DHARs réduisent en général toutes ces substrats même si des différences d'efficacité catalytique sont observées. Conformément au rôle crucial de la cystéine catalytique, la substitution en alanine provoque une perte totale d'activité de déglutathionylation, alors qu'une substitution en sérine permet dans le cas des GSTLs et GSTOs de catalyser des réactions de glutathionylation sur le CDNB et le phenethyl-ITC par exemple. Cependant, ce changement de réactivité n'est pas observé pour les GHRs et les DHARs (données non publiées). Il semble donc que la nature de l'acide aminé catalytique et sa position au sein des séquences primaires des Cys-GSTs déterminent donc le profil

réactionnel de ces enzymes mais il y a surement d'autres déterminants structuraux qui expliquent que les membres de certaines classes sont incapables de reconnaître certains substrats. Pour les DHARs, cela pourrait être lié au fait qu'elles sont spécialisées dans la réduction du DHA et pour les GHRs que leur structure quaternaire est très spécifique.

Ainsi, pour analyser plus finement l'existence de spécificités de substrats, des essais de déglutathionylation de composés glutathionylés plus complexes ont été entrepris. Des différences notoires quant aux substrats qu'elles sont capables de prendre en charge ont été parfois observées. Les GSTLs, à l'instar des GSTOs, sont capables de prendre en charge les dérivés phénacyl alors qu'elles sont incapables de déglutathionyler les dérivés de quinones tels que la ménadione. Les GHRs, à l'inverse, prennent en charge les dérivés de quinone mais ne peuvent prendre en charge les dérivés phénacyl. Les GSTOs, contrairement aux GSTLs et GHRs, sont quant à elles capables de déglutathionyler la tetralone. Tout ceci est intéressant car un monomère de GSTL a une structure très proche d'une sous-unité d'un dimère de GSTO. Cependant, la résolution de la structure de 2 GSTLs de peuplier a permis de pointer quelques différences. Les GSTLs possèdent notamment une hélice α9 qui vient recouvrir le site actif, propriété qui pourrait donc être à l'origine de la différence de reconnaissance de substrats observée. Une autre explication possible serait une différence subtile au niveau des résidus formant le site H. Seule la détermination de structures de GSTLs en complexe avec des substrats permettra d'effectuer une comparaison avec celles déjà connues des GSTOs. Les DHARs, quant à elles, ne peuvent catalyser aucune des réactions mentionnées plus haut (données non publiées), mais elles peuvent, de même que toutes les autres Cys-GSTs, les Grxs et les Trxs, déglutathionyler la quercétine. Il semble donc que la présence d'une cystéine réactive exposée soit suffisante pour effectuer cette réaction. Ceci remet en question la proposition que les flavonoïdes et la quercétine en particulier constituent le substrat physiologique et la fonction majeure des GSTLs (Dixon and Edwards 2010). Le fait que la GSTF2 D'*A. thaliana* et d'autres GSTFs aient également cette capacité de lier la quercétine posait déjà question (Mueller, Goodman et al. 2000; Smith, Nourizadeh et al. 2003; Dixon, Sellars et al. 2011).

Concernant les GHRs, leurs propriétés structurales particulières, en comparaison des autres GSTs à cystéine catalytique, est probablement à l'origine de leurs caractéristiques fonctionnelles tout à fait atypiques. En effet, ces propriétés fonctionnelles vis-à-vis des quinones sont, à l'heure actuelle, exclusives aux GHRs, aussi bien d'origines fongiques et bactériennes que végétales. Ceci suppose que ces propriétés sont la conséquence du mode de

dimérisation unique de ces enzymes et peut être de certaines caractéristiques du site H (Figure 64).

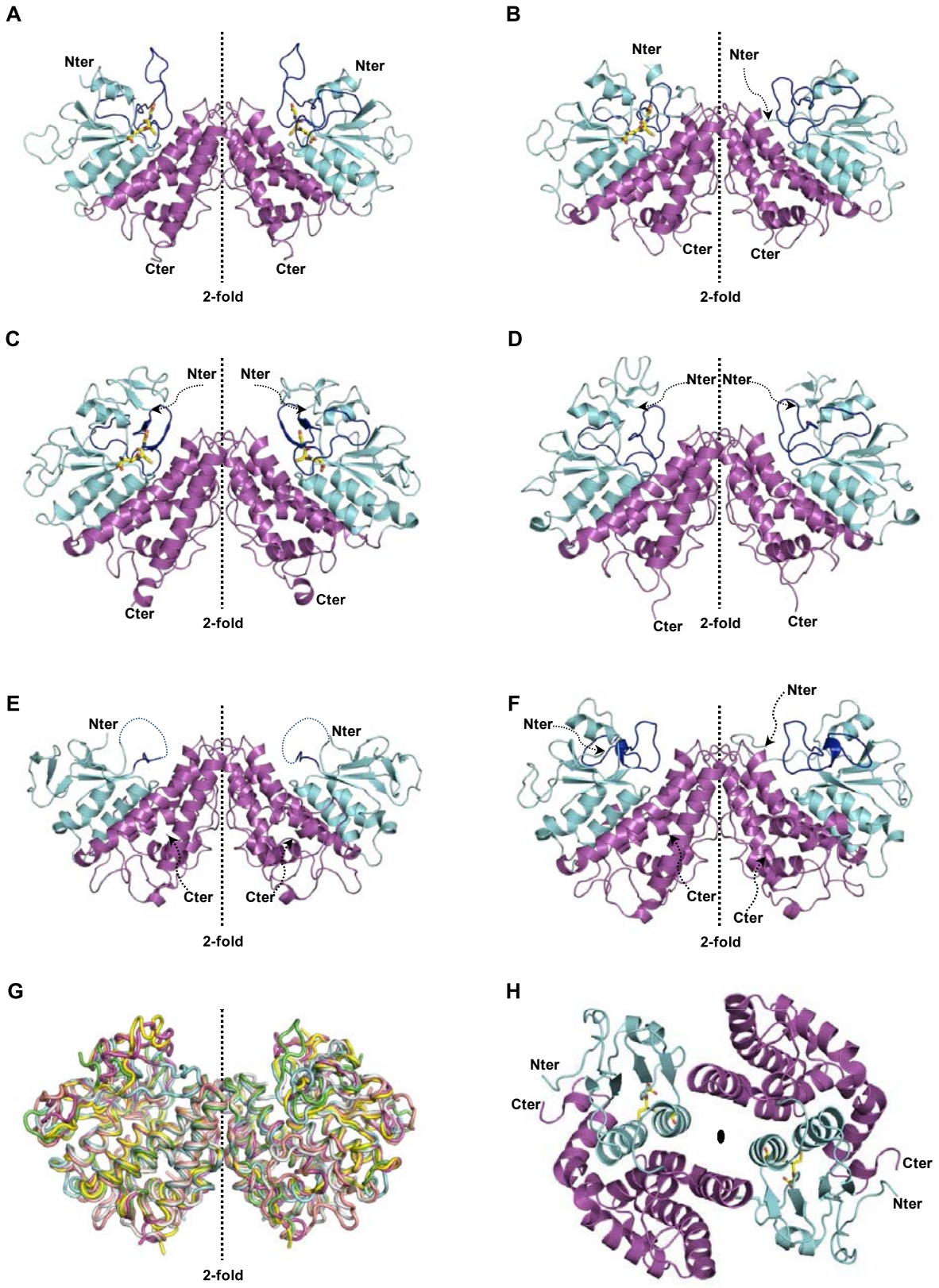


Figure 64 : Comparaison des structures tridimensionnelles des GHRs.
Les représentations des structures tridimensionnelles des différentes GHRs ont été réalisées à partir des codes PDB disponibles et à l'aide du logiciel Pymol. Les structures 3D correspondent à (A) PtGHR1 de P. trichocarpa

(code PDB : 4USS), (B) PcGHR1 de P. chrysosporium (code PDB : 3PPU), (C) EcYqjG d'E. coli (code PDB : 4G0L), (D) ScPcpF de Sphingobium chlorophenolicum (code PDB : 4FQU), (E) une GHR de Corynebacterium glutamicum (code PDB : 3M1G) et (F) une GHR de Gordonia bronchialis (code PDB : 4PTS). Les structures 3D de ces GHRs ont été superposées (G) afin d'identifier les domaines variables. Pour comparaison, la GSTO1 humaine est représentée (H). Les domaines N-terminaux et C-terminaux sont représentés respectivement en cyan et violet. Au sein des GHRs, la boucle très variable entre le brin β2 et l'hélice α2 est représentée en bleu. Pour la GHR de C. glutamicum, cette boucle est représentée en pointillés en raison de l'absence de densité électronique pour la région comprise entre les résidus 96 et 133. Pour chaque protéine, les monomères s'associent en dimère selon un axe de symétrie structural C2 (ligne en pointillé ou ovale noir). Le glutathion est représenté en bâtonnets lorsqu'il est présent.

En effet, au niveau du site H, une triade de tyrosine forme un réseau de liaisons hydrogène à une distance compatible avec le substrat (Green, Hayes et al. 2012). Ces résidus ne sont généralement pas conservés dans les séquences de GSTOs et GSTLs (Figure 65). De plus, les comparaisons réalisées entre les sites H des GHRs et ceux d'autres GSTs montrent qu'il est plus globalement profond dans les GHRs et compatible avec la géométrie plane des quinones. Toutefois, plusieurs interprétations s'opposent concernant la reconnaissance des substrats par les GHRs. En se basant sur une structure de GHR bactérienne en complexe avec la ménadione, il a été décrit, proposé, que la reconnaissance du groupement quinone par les GHRs serait uniquement le résultat de sa compatibilité stérique avec le site H lors de la reconnaissance du glutathion par le site G. En d'autres termes que la taille du site actif et l'absence d'interaction spécifique avec le squelette quinone permettaient aux GHRs d'accepter ces substrats (Green, Hayes et al. 2012). Ceci n'explique par exemple pourquoi les GHRs ne réduisent pas la tetralone glutathionylée, substrat plus petit et ayant la même base aromatique que la ménadione mais une fonction cétone et un groupement méthyl en moins (Figure 66).

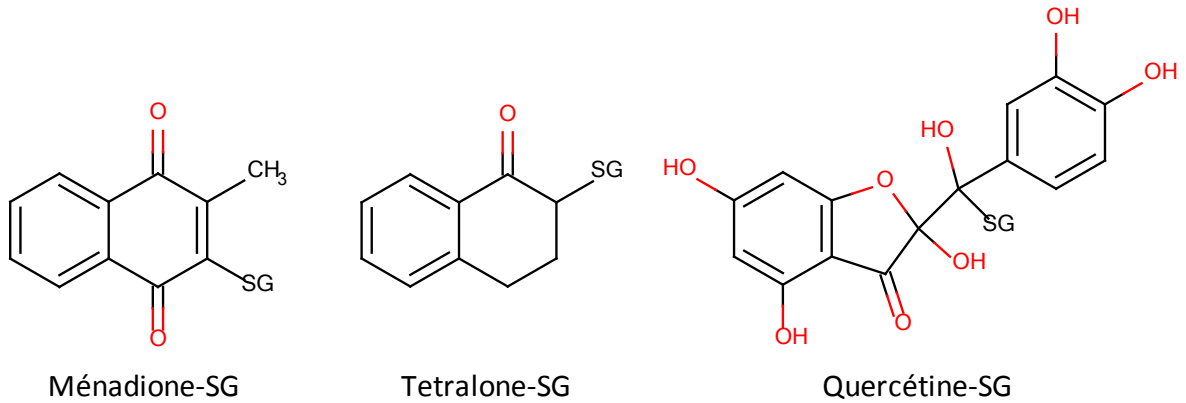


Figure 66 : Représentation de la structure de la ménadione glutathionylée, de la tetralone glutathionylée et de la quercétine glutathionylée.

Il semble donc que la présence d'un motif quinone est indispensable pour une reconnaissance par les GHRs et la spécificité pourrait donc provenir d'interactions spécifiques établies au niveau des deux atomes d'oxygène. Par le fait, l'affinité plus forte des GHRs pour la forme réduite (hydroxyle) de la ménadione que pour la forme oxydée (cétone) suggèrent l'existence d'interactions favorisant la fixation du substrat réduit. Par ailleurs, la spécificité des GHRs pour les quinones pourrait aussi provenir de la configuration des substrats. En effet, les liaisons carbone-soufre des substrats glutathionylés de dérivés quinones sont en configuration *sp2* alors que les substrats (tetralone, dérivés phénacyl) spécifiques des autres classes de Cys-GSTs sont en configuration *sp3* avec le glutathion. Néanmoins, la capacité des GHRs à déglutathionyler la quercétine glutathionylée, une molécule en conformation *sp3* avec le glutathion et qui ne possède pas de motif quinone, va à l'encontre de la nécessité d'avoir un motif quinone et une conformation *sp2*. Il est important de noter que ce substrat est très particulier puisque n'importe quelles oxydoréductases (Grxs, Trxs, et toutes les Cys-GSTs) possèdent la capacité de catalyser cette réaction suggérant qu'il n'y a pas de reconnaissance spécifique. Des expériences complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer l'importance de des fonctions portées par ces molécules cycliques.

```
                 ....|....| ....|....|                                        ... .|....|...
                     5         15                                                  25
Pt-GHR1          MARSAIDETS DTGAFKRTAS ---------- ---------- ---------- -------TFR NFISKEPNSQ 33
Pt-GHR2          MSQLAPSDSS GRYTRPASKF ---------- ---------- ---------- ---------- ----RLNPPF 26
Pc-GHR1          MSFTTGSTLQ HQEAQLQGAK DETVTQLEQR AAGGASHELQ SDISKMKTED DGSFKRKAAS FRNWIQPNGD 70
Ec-YqjG          MGQLIDGVWH DTWYDTKSTG GKFQRSAS-- ---------- ---------- -AFRNWLTAD GAPGPTGTGG 47
Sc-PcpF          MGLLIDGVWR DAWYDTKSSG GRFVRKESQ- ---------- ---------- ---------- YRGGLD--AG 37
Cg-GSTX          SNAMANTSSD WAGAPQNASA DGEFVRDTN- ---------- -----YIDDR IVADVPAGSE PIAQEDGTFH 51
Gb-GSTX          MAPDTHSSDS EQGSYVTTG- -QEFVRDTKY ---------- ---------- --------IE TRITADGRDG 40
Hs-GSTO1-1       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----MSGESA RSLGKGSAPP 16
Pt-GSTL3         ---------- ---------- ---------- ---------- -----MATAS ALDKSVPEKL APPLDATAEQ 25

                          β1         α1          β2
                 .|....|... .|....|... .|....|... .|....|.... |....|... .|....|... .|....|.
                  35        45        55         65         75         85         95
Pt-GHR1          FPPESGRYHL YVSYACPWAS RCLAYLKIKG LEKAIAFTSV KPIWERTKES DEHMGWVFPA SETEEAGA-- 101
Pt-GHR2          TLQNSTTLHL YVGLPCPWAH RTLIVRALKG LEDAVPVSIA GPGQDG---- ----SWEFKD IPISNRDRNI  88
Pc-GHR1          FTPEKGRYHL YVSYACPWAT RTLIVRKLKG LEDFIGVTVV SPRMGSN--- ----GWPFAN VDPFPAAD-- 131
Ec-YqjG          FIAEKDRYHL YVSLACPWAH RTLIMRKLKG LEPFISVSVV NPLMLEN--- ----GWTFDD S--FPGAT-- 106
Sc-PcpF          FRGEPGRYHL YAGFACPWAH RVLIMRALKG LEEMISVSMV NAYMGEN--- ----GWTFLP G--------- 91
Cg-GSTX          WPVEAGRYRL VAARACPWAH RTVITRRLLG LENVISLGLT GPTHDVR--- ----SWTFDL DPN------- 110
Gb-GXTX          YPVEPGRYRL IAARACPWAN RTLIVRRLLG LENVLSLGLC GPTHDKN--- ----SWTFDL DPG------- 96
Hs-GSTO1-1       GPVPEGSIRI YSMRECPFAE RTRLVLKAKG IRHEVININL KNKP------ ---------- ---------- 60
Pt-GSTL3         PPLFDGTTKL YTCYTCPFAQ RVWITRNFKG LQDEIKLVPL ILQNRP---- ---------- ---------- 71
                                 $                                                  $
                                  α2                 β3        β4        α3
                    ...|... .|....|... .|.. ..|.. ..|....|.. ..|....|.. ..|....|.. ..|..  ..|
                      105        115        125        135        145        155        165
Pt-GHR1          ---EPDTLNG ARSIRELYEL ASTN-YAGKY TVPVLWDKKL KTIVNNESSE IIRMFNTEFN DIAEN--AAL 165
Pt-GHR2          LVPGRDNANG CRNLKGVYGL RRSGGYSGRA TVPMLWDVEK KEVGCNESYD IIEFFNSGLN GLARN--PGL 156
Pc-GHR1          ----SDPLNN AQHVKDLYLK VKPD-YDGRF TVPVLWDKHT GTIVNNESSE IIRMFNTAFN HLLPEDKAKL 196
Ec-YqjG          ----GDTLYQ NEFLYQLYLH ADPH-YSGRV TVPVLWDKKN HTIVSNESAE IIRMFNTAFD ALGAK---AG 168
Sc-PcpF          DDVVPDSING ADYLYQVYTA ADPT-YTGRV TIPILWDKVE KRILNNESSE IIRILNSAFD DVGAL---PG 157
Cg-GSTX          ---HLDPVLQ IPRLQDAYFN RFPD-YPRGI TVPALVEESS KKVVTNDYPS ITIDFNLEWK QFHR--EGAP 171
Gb-GSTX          ---GVDPVLG IPRLKDAYEK RFPG-YPKGI TVPAVVEIAT GEVVTNDFPQ ITIDFSLEWT AYHR--DGAP 160
Hs-GSTO1-1       ---------- --EWFF KKN PF-------G LVPVLENSQ- -GQLIYESAI TCEYLDEAYP --------GK 100
Pt-GSTL3         ---------- --AWYPEKVY PP------N- KVPSLEHNG- --KITGESLD LIKYLESNFE --------GP 111
                                                  $            $$
                                        α4                  α5
                 ...  .|... .|....|... .|....|... .|....|... .|....|... .|....|...    .|....|
                              175        185        195        205        215           225
Pt-GHR1          DLY--PSHLQ AQIDETNGWV YDGINNGVYK CGFARKQGPY EEAAIQLYEA LDKCEEILGR ---QRYICGN 230
Pt-GHR2          DLS--PKELK GKIGEWNGLI YPNVNNGVYR CGFAQSQDAY DSAVNGLFTT LEAVEDHLTT ---SRYLCGD 221
Pc-GHR1          DLY--PESLR AKIDEVNDWV YDTVNNGVYK SGFASTQKAY EAAVIPLFES LDRLEKMLEG ---QDYLIGG 261
Ec-YqjG          DYY--PPALQ TKIDELNGWI YDTVNNGVYK AGFATSQEAY DEAVAKVFES LARLEQILG- --QHRYLTGN 233
Sc-PcpF          DYY--PAEFR PEIDRINARV YETLNNGVYR SGFATTQEAY EEAFYPLFDT LDWLEEHLTG ---REWLVGD 222
Cg-GSTX          NLY--PAELR EEMAPVMKRI FTEVNNGVYR TGFAGSQEAH NEAYKRLWVA LDWLEDRLS- --TRRYLMGD 236
Gb-GSTX          QLY--PEHLR AEIDEVSKGI YTEVNNGVYR CGFAGSQDAY DAAYDRLFTK LDELSERLAQ ---QRYLVGD 225
Hs-GSTO1-1       KLLPDDPYEK ACQKMILELF SK-VPSLVGS FIRSQNKEDY AGLKEEFRKE FTKLEEVLTN -KKTTFFGGN 168
Pt-GSTL3         SLLPKDPAKK EFAEELFSYT DK-FNGTVYT A-------FK GDLAKEAGPA FDHLENALHK FDDGPFFLGK 173

                                α6                          α7          α8      α9
                 ....|....| ....|....| ....|....| .. ..|.... |....|. .. .|....|. . ..|....|..
                    235        245        255        265        275        285        295
Pt-GHR1          TLSEADIKLF VTLIRFDEVY AVHFKCNKKL LR-DYPNMFN YTKDIFQ-IP GMSSTVNM-Q HIKRHYYGSH 297
Pt-GHR2          TLTLADVCLF TTLIRFDIVY NVLFKCTKKK LI-EYPNLHG YMRDIYQMPK VAETCNFS-A IMDGYYKVLF 289
Pc-GHR1          QLTEADIRLF VTIVRFDPVY VTHFKCNLRT IRDGYPNLHR WMRKLYWGNP AFKDTCNF-E HIKTHYFWSH 330
Ec-YqjG          QLTEADIRLW TTLVRFDPVY VTHFKCDKHR IS-DYLNLYG FLRDIYQ-MP GIAETVNF-D HIRNHYFRSH 300
Sc-PcpF          RLTEADIRLF PTLVRFDAIY HGHFKCNLRR IA-DYPNLSR LVGKLAS-HE RVAPTINL-R HAKAHYYGSH 289
Cg-GSTX          HITEADIRLY PTLVRFDAVY HGHFKCGRNK IT-EMPNLWG YLRDLFQ-TP GFGDTTDF-T EIKQHYYITH 303
Gb-GSTX          TITEADVRLF TTLARFDAVY HGHFKCNRSK LS-EMPVLWA YARDLFQ-TP GFGDTTDF-T QIKQHYYIVH 292
Hs-GSTO1-1       SISMIDYLIW PWFERLEAMK LN------EC VD-HTPKLKL WMAAMKE-DP TVSALLTSEK DWQGFLELYL 230
Pt-GSTL3         EFSLVDIAYI PFVERLNIFL LEVFK--YDI TA-GRQKLAA WIEEVNK-IE AYKQTKTDPK ELVEFYKKRF 239

                 ..|....|.. ..|.. ..|. ...|....|. ...|....|. ...|....|. ...| ....|..
                      305        315        325        335        345        355
Pt-GHR1          PTVNPFGIIP LGPDI-DYSS PHDRNRFSS- ---------- ---------- ------- 324
Pt-GHR2          P-LNPGSICP VMPSGCEHDV LLSTPHNRES LSLANKTTKQ DH-------- ------- 329
Pc-GHR1          TFINPHRIVP IGPIP-DILP LDA------- ---------- ---------- ------- 351
Ec-YqjG          KTINPTGIIS IGPWQ-DLDE PHGRDVRFG- ---------- ---------- ------- 327
Sc-PcpF          PSVNPTGIVP VGPAQ-PLPG LTLQS----- ---------- ---------- ------- 312
Cg-GSTX          AEINPTRIVP VGPDLSGFAT PHGREKLGGS PFAEGVTLPG PIPAGEEVKN PEPFQK- 359
Gb-GXTX          SDINPTQIVP KGPDLRNWLT PHHREELGGR PFGDG-TPPG PPIAAEVVPA QNWVPTS 347
Hs-GSTO1-1       QNSPEACDYG L--------- ---------- ---------- ---------- ------- 240
Pt-GSTL3         LA-------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------- 240
```

Figure 65 : Alignement de séquences des GHRs, de HsGTO1 et de PtGSTL3.

Les résidus identiques pour toutes ces GSTs sont surlignés en noirs. Les brins β et les hélices α sont positionnés suivant la structure de PtGHR1 et les résidus les composants sont respectivement surlignés en gris et en jaune. Les résidus composant l'interface de dimérisation sont représentés en bleu. La numérotation correspond à celle de PtGHR1. Les $ signalent les résidus en interaction directe avec le glutathion alors que les résidus surlignés en rouge correspondent à la triade de tyrosines conservées trouvée au sein du site H.

3. Fonctions cellulaires supposées des Cys-GSTs chez les plantes

Bien que les rôles physiologiques des différentes Cys-GSTs ne soient pas encore élucidés, elles possèdent toutes la capacité de réaliser des réactions de déglutathionylation. La spécialisation de ces protéines doit donc provenir de leur localisation cellulaire ou subcellulaire, de leurs territoires d'expression ou de variations structurales qui leur permettent d'accommoder des substrats différents ou de différences d'efficacités catalytiques importantes.

Ce dernier cas de figure est illustré par les DHARs. En effet, bien que les Grxs et les Cys-GSTs de plantes étudiées (GHRs, GSTLs) sont capables d'effecteur la réduction du DHA en Asc *in vitro*, les efficacités catalytiques des DHARs sont généralement bien supérieures de l'ordre de 10^7 M^{-1} s^{-1} rapport à 10^4 -10^5 M^{-1} s^{-1} (Dixon, Davis et al. 2002; Tang and Yang 2013). Il est donc en principe admis que la fonction biologique des DHARs concerne bien la réduction du DHA en ascorbate. Toutefois, les DHARs n'ont pas été identifiées partout où il y avait de l'ascorbate. Par exemple, les isoformes de peuplier ont été localisées dans les plastes ou le cytosol, mais pas dans les peroxysomes contrairement à la GSTL2 d'Arabidopsis (Dixon, Hawkins et al. 2009), ni dans l'apoplasme, compartiment où il y a des concentrations importantes d'ascorbate et une activité DHAR (Sehrawat and Deswal 2014). La question qui se pose est donc l'existence de transport entre certaines membranes pour la réduction des formes oxydées ou de l'existence de systèmes alternatifs, notamment d'autres Cys-GSTs, voire des Grxs dans l'apoplasme. En effet, les prédictions d'adressage indiquent que plusieurs Grxs (GrxC3 et C4 notamment) seraient localisées dans ce compartiment au pH acide (Rouhier, Gelhaye et al. 2004). Le pKa très acide (autour de 3 ou 4) des cystéines catalytiques des Grxs pourrait être un atout important dans ce compartiment par rapport aux Cys-GSTs pour maintenir la forme thiolate.

L'argument des variations structurales est bien illustré par les GHRs puisque leur mode de dimérisation et leur site H atypiques semblent leur conférer une capacité à spécifiquement déglutathionyler les (hydro)quinones. Cette propriété pourrait donc être centrale pour les mécanismes redox cellulaires. En effet, les hydroquinones, issues du métabolisme du benzène et des dérivés phénoliques, représentent un groupe de molécules très réactives vis-à-vis des macromolécules biologiques. Il a par exemple été montré que les hydroquinones peuvent interférer avec l'ubiquinone mitochondriale et perturber de ce fait le transport des électrons de la chaîne respiratoire (Magiri, Konji et al. 1995). De plus, ces composés sont à l'origine de la

formation d'espèces oxygénées réactives, lors d'échanges d'électrons entre les formes oxydées et réduites, mais également responsable d'une déplétion du GSH cellulaire par la formation spontanée d'adduits covalents avec le glutathion (Buffinton, Ollinger et al. 1989; Monks, Hanzlik et al. 1992; Hill, Kleiner et al. 1993; Bolton, Trush et al. 2000). L'absence de GHRs chez les mammifères pose quelques questions puisque des dommages liés aux hydroquinones ont également été décrit. Néanmoins, il a été montré que la voie dépendante du glutathion ne jouait pas un rôle primordial dans la résistance face aux quinones chez les mammifères (Miura, Shinkai et al. 2011). En effet, d'autres voies métaboliques sont impliquées, notamment au travers de la synthèse de conjugués glucuronidés. Ces études suggèrent donc que la voie de détoxication des quinones chez les mammifères est essentiellement dépendante d'une glucuronidation et non d'une glutathionylation (Shangari, Chan et al. 2005) (Nishiyama, Ohnuma et al. 2008; Taguchi, Shimada et al. 2008). La présence de GHRs au sein des organismes photosynthétiques, et plus particulièrement au sein des chloroplastes chez le peuplier, pourrait ainsi permettre de (i) limiter le stress oxydant généré par les hydroquinones et le métabolisme des composés phénoliques, (ii) protéger les quinones essentielles à la chaîne de transport des électrons chloroplastique, (iii) restituer le glutathion consommé lors de glutathionylation spontanée des quinones, et (iv) restituer les quinones/cycle benzéniques pour le métabolisme des composés phénoliques.

L'argument concernant la spécialisation des Cys-GSTs en fonction de leur localisation cellulaire ou subcellulaire pourrait être illustré par les mPGES2s puisque la présence du domaine d'ancrage à la membrane suggère que les enzymes végétales devraient être localisées au niveau de la membrane plasmique comme leurs homologues chez les mammifères. Par contre, le rôle de ces protéines est plus incertain. En effet, ces protéines interviennent dans le métabolisme des prostaglandines chez les mammifères, mais ces molécules sont totalement absentes chez les organismes photosynthétiques. Cependant, les prostaglandines appartiennent à une classe plus large de métabolites secondaires que sont les oxylipines. Ces molécules sont des composés oxygénés qui dérivent du métabolisme des acides gras polyinsaturés, acide arachidonique chez les animaux, et acide linoléique ou linolénique chez les plantes. Il n'existe pas d'évidence avérée concernant la production basale ou le stockage de ces molécules. Les oxylipines sont généralement formées suite à l'oxydation des acides gras membranaires par des dioxygénases ou des monooxygénases ou dans le cas des phytoprostanes de l'action directe des EORs sur les lipides cellulaires, notamment au travers de la peroxydation en chaîne des lipides membranaires. Chez les

plantes, ces octadécanoïdes jouent un rôle essentiel dans la protection vis-à-vis des pathogènes en agissant en tant que molécule toxique, molécule signal ou précurseur d'une phytohormone, l'acide jasmonique. Outre son rôle dans les mécanismes de défense, cette hormone intervient également dans le développement de la plante, la germination et la formation des organes reproducteurs. Bien que cette fonction reste très hypothétique, la présence de mPGES2 chez les plantes pourrait être liée au métabolisme des oxylipines. Ces protéines pourraient alors jouer un rôle dans le métabolisme des acides gras en permettant la synthèse de composés, le recyclage de certaines molécules ou la dégradation des oxylipines devenues obsolètes.

Les GSTLs pourraient être mentionnées comme un autre exemple expliquant la spécialisation des Cys-GSTs en fonction de leur territoire d'expression et de leur localisation. En effet, les gènes de peuplier sont majoritairement exprimés dans les plastes ou le cytosol de tissus riches en métabolites secondaires et flavonoïdes en particulier comme les fleurs et les fruits. Comme mentionné auparavant, l'isoforme plastidiale est surement la version ancestrale de ces GSTLs. Les analyses biochimiques suggèrent que les GSTLs sont fortement impliquées dans le métabolisme secondaire, notamment dans le métabolisme des composés phénoliques, ce qui expliquerait d'autant mieux que leur présence est restreinte aux végétaux supérieurs. En effet, les expériences d'isolement de substrats réalisés avec les enzymes de blé ou d'arabette ont montré la fixation de plusieurs flavonoïdes par les GSTLs et leur capacité de réaliser des réactions de déglutathionylation de la quercétine (Dixon and Edwards 2010). Il a ainsi été proposé que les GSTLs participent au recyclage des flavonoïdes. En effet, une fois oxydés, les flavonoïdes peuvent réagir *in vivo* avec le glutathion et conduire à la formation d'espèces glutathionylés. Les GSTLs pourraient ainsi être impliquées dans la régénération du pouvoir antioxydant porté par les flavonoïdes. Toutefois, les expériences réalisées *in vitro* avec les autres Cys-GSTs indiquent que cette réaction n'est pas très spécifiques des GSTLs. La comparaison des paramètres catalytiques obtenus avec différents substrats a mis en évidence une spécificité des GSTLs vis-à-vis des dérivés d'acétophénone glutathionylés, substrats pour lesquels les GSTLs présentent la plus forte activité molaire spécifique. Ceci pourrait également suggérer un rôle physiologique des GSTLs dans le métabolisme des acétophénones. Les molécules cétoniques sont des composés pouvant notamment réagir spontanément avec les molécules soufrées telles que le glutathion, entrainant la formation de composés glutathionylés (Akhtar 1979; Brundin, Ratnayake et al. 1982). Il a d'ailleurs été montré que suite à une forte exposition en acétophénones halogénées, ces dérivés induisent

une déplétion de la concentration intracellulaire en glutathion (Summer, Klein et al. 1996). Au travers de leur activité, les GSTLs peuvent ainsi permettre non-seulement de libérer/recycler le glutathion mais également de réincorporer les dérivés d'acétophénone au sein des voies métaboliques.

4. La recherche des substrats physiologiques des Cys-GSTs chez les plantes : une étape supplémentaire primordiale pour la compréhension de leur rôle.

L'utilisation de la génétique inverse constitue en général un outil puissant pour élucider le rôle de gènes/protéines candidats. Cependant, dans le cas de familles multigéniques, ce genre d'approche peut souvent se heurter à l'existence d'une certaine redondance entre les gènes. Cela a été le cas notamment pour certaines Trx h cytosoliques ou chloroplastiques, pour lesquelles il faut muter les gènes codant les thiorédoxines réductases pour observer des effets (Reichheld, Khafif et al. 2007; Wang, Liu et al. 2014). Cette approche n'est en général pas développée par le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse mais pourrait être utile dans notre cas puisque ces classes de Cys-GST sont formées d'un nombre somme toute assez restreint de gènes et surtout ils codent pour des enzymes qui n'ont pas nécessairement les mêmes localisations subcellulaires ou territoires d'expression. L'autre inconvénient est l'utilisation du peuplier, espèce pour laquelle il fallait passer jusqu'à présent par des approches d'ARN interférence pour inactiver des gènes.

Une approche alternative pour comprendre les fonctions biologiques et physiologiques portées par ces enzymes consisterait à identifier directement leurs substrats. En effet, la plupart des ligands/substrats des GSTs et plus particulièrement des Cys-GSTs sont inconnus. Ceux identifiés jusqu'ici sont soit des molécules modèles non-physiologiques, soit des molécules pour lesquelles on ne sait pas si elles subissent une transformation catalytique. Une étape de validation expérimentale visant par exemple à générer et tester enzymatiquement des molécules conjuguées avec le glutathion doit donc au minimum être réalisée. Le préalable est donc d'isoler et de purifier des substrats physiologiques naturels de peuplier. Pour cela, plusieurs stratégies d'isolement de substrats *in vitro* et *in vivo* sont possibles (Figure 67). Ce genre d'approche s'est avéré fonctionnel et a déjà prouvé son efficacité lors de la caractérisation de GSTs Tau d'*A. thaliana* qui lient des intermédiaires de porphyrines et d'acides gras (Dixon, Lapthorn et al. 2008; Dixon and Edwards 2009) ou de

certaines GSTLs *d'Arabidopsis thaliana* ou de blé (*Triticum aestivum*) qui lient des molécules dérivées du kaempférol (Dixon and Edwards 2010).

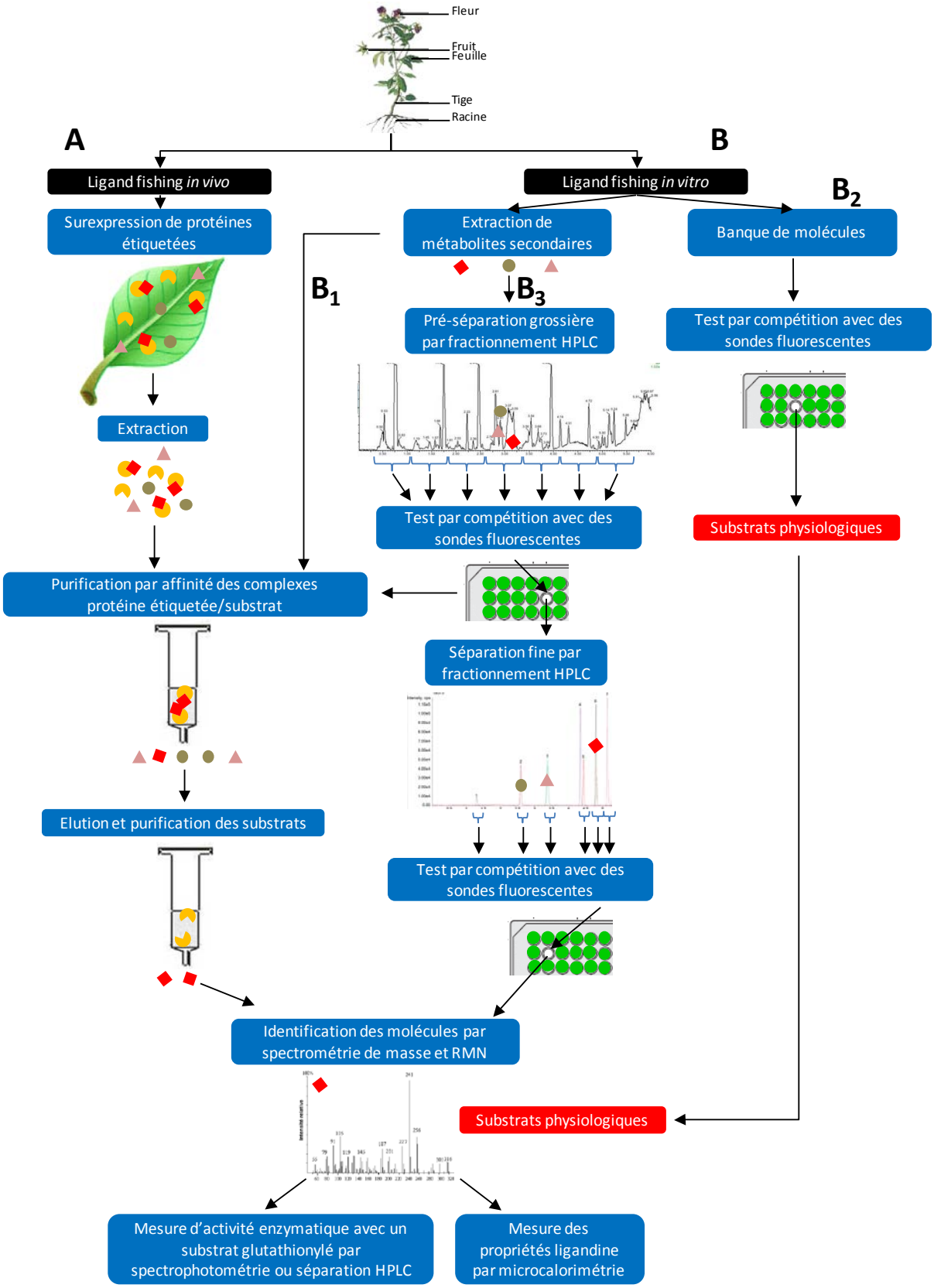


Figure 67 : Identification de substrats physiologiques.

Deux types d'approches, *in vivo* (A) et *in vitro* (B), sont envisagées afin d'isoler les substrats physiologiques des Cys-GSTs.
A : Des versions étiquetées des protéines d'intérêt sont surexprimées soit transitoirement soit de manière stable dans les organes et organites où elles sont normalement exprimées. Les protéines, seules ou en complexe avec un substrat, seront purifiées par chromatographie d'affinité. Après leur élution, les composés fixés aux protéines seront identifiés par spectrométrie de masse éventuellement couplée à une séparation en phase liquide et aussi si besoin par RMN.
B : Cette approche nécessite l'utilisation de protéines recombinantes. Dans un premier temps (B1), une protéine étiquetée ou immobilisée sur gel peut être directement incubée avec un pool de métabolites secondaires. L'obtention des substrats se fera comme précédemment. Une alternative est d'utiliser un test de compétition avec des sondes fluorescentes soit à partir de banques de molécules (B2), soit à partir d'extraits de plantes (B3). Dans ce dernier cas, il est nécessaire de réaliser au préalable un premier fractionnement permettant de séparer grossièrement ces composés avant les tests de compétition. Afin d'isoler la ou les molécule(s) d'intérêt, les complexes protéines-substrats pourraient être purifiés par chromatographie d'affinité ou les fractions présentant le plus d'inhibition seront fractionnées plus finement par HPLC et retestées par compétition avant identification.
Après identification des substrats, une validation de l'interaction est nécessaire. Ceci peut se faire par microcalorimétrie, appareil disponible au laboratoire. Cela aura le mérite également de quantifier les constantes d'affinité et éventuellement d'aider à discriminer entre une fonction ligandine et une fonction catalytique. Pour ce dernier point, les mesures d'activité ne sont pas si triviales à faire car cela requiert de générer des quantités importantes de substrats glutathionylés.

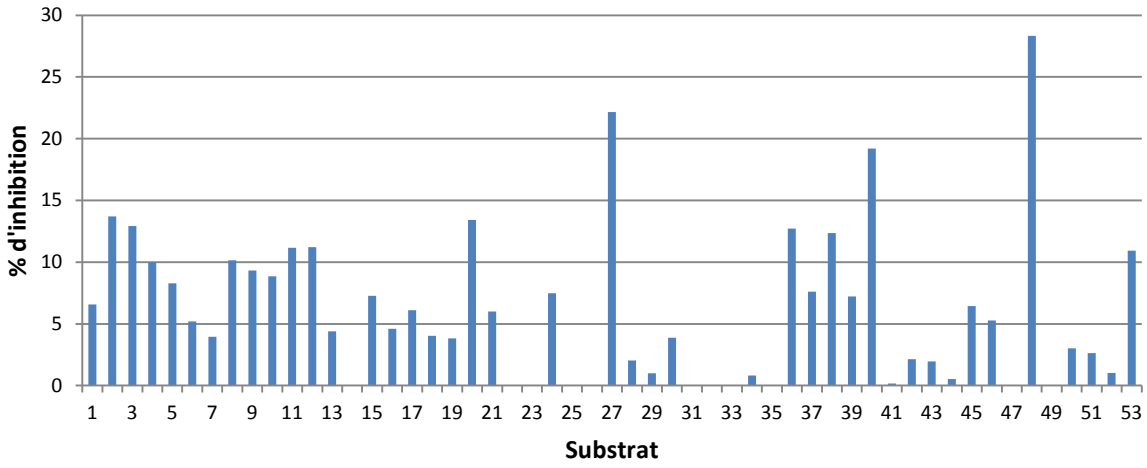
L'approche par isolement de ligands *in vitro* est a priori la méthode la plus simple et la plus rapide. En effet, du point de vue pratique, je pourrais tirer avantages des protéines recombinantes qui ont été produites. Ces dernières pourraient être immobilisées sur une matrice par fixation covalente (après activation au CNBr) ou non covalente dans le cas de protéines étiquetées par une séquence poly-histidine (adsorption sur une matrice saturée en ions nickel) puis exposées à des extraits bruts ou à des extraits préalablement fractionnés ou enrichis en métabolites secondaires. Par exemple, au cours de ce travail de thèse, j'ai montré que les deux GHRs ainsi que la GSTL1 de peuplier sont des protéines plastidiales dont les gènes sont exprimés préférentiellement dans les organes reproducteurs (fleurs et fruits). Les patrons d'expression tissulaire ainsi que les expériences de localisation constitueront un point de départ nous permettant de sélectionner les tissus et les compartiments cellulaires où cibler la recherche de substrats potentiels.

En ce qui concerne la recherche de substrats *in vivo*, il serait intéressant de mettre l'accent non seulement sur le modèle peuplier (*Populus trichocarpa*) et sur le tabac (*Nicotiana tabacum*), mais aussi sur la rue fétide (*Ruta graveolens*), le panais (*Pastinaca sativa*), le persil (*Petroselinum crispum*), la tomate (*Solanum lycopersicum*) ou le pamplemoussier (*Citrus paradisi*), plantes qui sont connues pour avoir des teneurs élevées en métabolites secondaires tels que les furanocoumarines, furanoquinolines, acridone, alcaloïdes, flavonoïdes (naringine, narirutine, quercétine, hespéridine, rutine, apigénine,

kaempférol, etc), caroténoïdes, imonoïdes (limonine, nomiline, limonoïdes glycosides), acide folique ou vitamine C. L'approche *in vivo* prendra quant à elle certainement un peu plus de temps, mais elle devrait avoir le mérite d'être plus fiable et moins biaisée. L'idée est de surexprimer des protéines étiquetées (séquence poly-histidine ou autre) directement dans la plante (méthodes d'agroinfiltration). Ces surexpressions pourraient être conduites notamment chez le tabac *Nicotiana benthamiana* qui est un bon modèle pour ce genre d'approche. Ces protéines étiquetées et surexprimées, qui auront donc un rôle d'« appâts à substrats » dans la plante, seront alors purifiées par chromatographie d'affinité. La difficulté de cette méthode réside dans le fait de trouver des conditions pour lesquelles le substrat restera fixé de façon optimale sur la protéine appât. Cette approche a déjà prouvé son efficacité car elle a permis l'identification de certains substrats (acide oxo-photodiènoique et acide chlorogénique) spécifiques de GSTs Tau d'Arabidopsis exprimées chez le tabac (Dixon and Edwards 2009). Toutefois ce sont des GSTs à sérine. Pour les GSTs à cystéine, il serait peut être plus judicieux d'exprimer une protéine mutée pour ce résidu afin de stabiliser le complexe protéine-substrat/ligand. Une comparaison des résultats obtenus par des expériences effectuées *in vitro* avec des versions sauvages ou mutées devra être réalisée avant de démarrer les expériences *in vivo*.

L'utilisation de ces méthodes est étroitement liée à la production de protéines recombinantes mais aussi à leur stabilité en présence de différents types de solvants utilisés pour extraire ces molécules. L'avantage d'étudier les Cys-GSTs par rapport aux GSTs à sérine est que les molécules glutathionylées sont plus hydrophiles et pourraient être extraites en solvant aqueux. Dans le cas des protéines liées de façon covalente (activation au CNBr), seuls les ligands seront élués, par exemple avec du méthanol puis caractérisés par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS). Dans le cas des protéines étiquetées, l'élution des ligands liés pourra être réalisé de façon similaire ou par l'intermédiaire des complexes protéine-substrat en présence d'imidazole. Cependant, l'affinité substrat/ligand ou la faible abondance du substrat pourraient être des facteurs limitant à cette stratégie. Il sera peut-être nécessaire d'augmenter la quantité de substrats intracellulaires en jouant sur les conditions de culture des plantes (conditions de stress notamment) tout en optimisant les méthodes d'extraction en incluant éventuellement une ou plusieurs étapes de pré-séparation. Une autre alternative pourrait être le criblage de banques chimiques, soit à partir de métabolites déjà purifiés ou fourni par la "chimiothèque nationale". Un criblage à haut débit de ces composés pourrait se faire par un

procédé faisant intervenir des sondes fluorescentes (CMFDA et ANS, 8-anilino-1-naphthalenesulfonate) spécifiques du site actif et entrant en compétition avec des substrats/ligands (Weerapana, Wang et al. 2010). Ces sondes ont déjà été utilisées lors de la caractérisation des Cys-GSTs de la classe Lambda de peuplier (voir article n°3). L'interaction de la protéine avec un substrat peut donc être détectée, la variation de la fluorescence reflétant la capacité de la sonde à rivaliser avec différents substrats en interaction avec la protéine. A l'aide de la CMFDA, il a été démontré que les protéines GSTO3 et GHR1 du champignon *P. chrysosporium* interagissent respectivement avec la phénylacétophénone glutathionylée et la thiodone (Meux, Morel et al. 2013). La seconde sonde pouvant être utilisée est l'ANS, un anion amphipathique qui est largement utilisé pour caractériser les sites de liaison de ligands dans les protéines. Lorsqu'il se trouve dans des milieux polaires, ce composé émet une faible intensité de fluorescence, mais une fois au contact d'un environnement hydrophobe, au niveau d'une poche hydrophobe d'une protéine par exemple, cette émission de fluorescence va augmenter considérablement. Cette méthode a été utilisée avec succès au laboratoire lors de la caractérisation des GSTs de la classe FuA de *P. chrysosporium*. Ces protéines fixent d'une part des molécules glutathionylées et d'autre part des extractibles de bois tels que la vanilline, l'acide chloronitrobenzoique, l'hydroxyacétophénone, des catéchines et des aldéhydes sulfatés (Mathieu, Prosper et al. 2012; Mathieu, Prosper et al. 2013).



<u>Figure 68:</u> Tests de compétition entre différentes coumarines et furocoumarines avec la sonde fluorescente CMFDA pour la fixation au niveau du site catalytique de PtGSTL3.
L'esculétine (27), la fraxétine (48) et, dans une moindre mesure, la 5-hydroxy-xanthotoxine (40) sont les molécules présentant les plus fortes inhibitions de fixation de la sonde.

J'ai ainsi débuté des tests de compétition en utilisant la GSTL3 de peuplier et la sonde fluorescente CMFDA à partir d'une banque de molécules comportant différentes coumarines et furocoumarines fournie par le Pr. Frédéric Bourgaud (LAE, Université de Lorraine). Les premiers résultats de ce criblage de molécules mettent en avant certaines interactions. Si certaines molécules ne semblent pas inhiber la fixation de la sonde sur la protéine, d'autres en revanche sont fortement liées à la protéine et montrent des constantes d'inhibition de l'ordre du micromolaire (Figure 68). L'analyse comparée des structures chimiques de ces différentes molécules a permis d'identifier que la position et la nature des substitutions sur les noyaux coumarines ou furocoumarines semblent primordiaux pour leur reconnaissance.

Ces méthodes par compétition présentent des risques similaires à ceux existant dans les méthodes d'isolement par utilisation d'appâts protéiques, en particulier ceux concernant les affinités des substrats. D'autres sondes fluorescentes telles que la fluorescéine, pourraient être également utilisées en utilisant des techniques de polarisation de fluorescence. Ce procédé ne nécessiterait pas d'activité enzymatique, contrairement à la CMFDA qui nécessite une activité estérase pour activer la sonde. Une autre stratégie alternative consisterait à utiliser des dosages par déplacement thermique, aussi appelé fluorimétrie à balayage différentiel, méthode qui pourrait contourner le problème de la faible affinité de la protéine pour son substrat, étant donné qu'elle ne requiert pas de compétition entre une sonde et un composé. Cette technique est basée sur le fait que la dénaturation thermique des protéines est différente quand ces dernières sont complexées à un substrat par rapport à la protéine seule. La température de fusion est déterminée grâce à la liaison du SYPRO orange, colorant fluorescent qui se lie de manière sélective sur les régions hydrophobes qui deviennent exposées lors de la dénaturation.

Une fois que les molécules liées aux Cys-GSTs seront identifiées, un point important est de déterminer si elles sont substrats ou ligands. Il sera donc nécessaire de détenir suffisamment de matériel (obtenus à partir d'extraits ou de produits commerciaux) afin de générer des formes conjuguées de ces molécules au GSH. Ceci pourrait être entrepris par voies enzymatique ou chimique en collaboration avec le Pr. Christine Gérardin (LERMAB, Université de Lorraine). La capacité des Cys-GST à déglutathionyler ou à fixer ces substrats sera ensuite testée par des méthodes spectrophotométriques ou par HPLC quantitative. L'identification des substrats aura également des répercutions sur la caractérisation structurale de ces enzymes, puisque la localisation exacte et les différences entre site H, site de fixation de divers substrats, et site L pour « ligandine » dédié au transport ou au stockage

de divers ligands ont rarement été mises en évidence (Oakley, Lo Bello et al. 1999; Mathieu, Prosper et al. 2012; Mathieu, Prosper et al. 2013). Le "site L" a été décrit pour la première dans la structure cristalline d'une GST Sigma de calmar (Ji, von Rosenvinge et al. 1996). L'obtention de structures tridimensionnelles de Cys-GSTs complexées à un ligand ou à un substrat (expériences de co-cristallisation ou de trempage de cristaux couplées à des méthodes de diffractions aux rayons X voire de RMN) permettra sans doute de cartographier et de décrire plus précisément ces sites différents de liaison.

En conclusion, l'identification des substrats physiologiques des Cys-GSTs chez les plantes représente une voie de recherche primordiale et ambitieuse pour la compréhension de leurs rôles chez les plantes. Ces recherches contribueront très certainement à mieux cerner les fonctions physiologiques portées par ces enzymes et probablement à étendre nos connaissances sur la biosynthèse des métabolites secondaires, le catabolisme, le stockage ou le transport cellulaires.

Références

Références

Abel, E. L., T. K. Bammler, et al. (2004). "Biotransformation of methyl parathion by glutathione S-transferases." Toxicol Sci **79**(2): 224-232.

Adam-Vizi, V. and C. Chinopoulos (2006). "Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species." Trends Pharmacol Sci **27**(12): 639-645.

Agarwal, S. (2007). "Increased antioxidant activity in Cassia seedlings under UV-B radiation." Biologia Plantarum **51**(1): 157-160.

Akhtar, M. H. (1979). "Sequential participation of glutathione and sulph-hydryl(s) in reductive dechlorination of 2,4-di-, and 2,4,5-trichloro phenacyl chlorides by soluble fraction (105,000 x g) of chicken liver homogenate." J Environ Sci Health B **14**(1): 53-71.

Allocati, N., L. Federici, et al. (2009). "Glutathione transferases in bacteria." The FEBS journal **276**(1): 58-75.

Allocati, N., L. Federici, et al. (2008). "Cysteine 10 is critical for the activity of Ochrobactrum anthropi glutathione transferase and its mutation to alanine causes the preferential binding of glutathione to the H-site." Proteins **71**(1): 16-23.

Alscher, R. G., N. Erturk, et al. (2002). "Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants." J Exp Bot **53**(372): 1331-1341.

Amarnath Satheesh, M. and L. Pari (2006). "The antioxidant role of pterostilbene in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats." J Pharm Pharmacol **58**(11): 1483-1490.

Apel, K. and H. Hirt (2004). "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction." Annu Rev Plant Biol **55**: 373-399.

Apodaca, G. (2002). "Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli." Am J Physiol Renal Physiol **282**(2): F179-190.

Aposhian, H. V., R. A. Zakharyan, et al. (2004). "A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species." Toxicol Appl Pharmacol **198**(3): 327-335.

Armstrong, G. A. and J. E. Hearst (1996). "Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis." FASEB J **10**(2): 228-237.

Armstrong, R. N. (1997). "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases." Chemical research in toxicology **10**(1): 2-18.

Asada, K. (1999). "THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons." Annual review of plant physiology and plant molecular biology **50**: 601-639.

Asada, K. (2006). "Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions." Plant physiology **141**(2): 391-396.

Atkinson, H. J. and P. C. Babbitt (2009). "An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations." PLoS Comput Biol **5**(10): e1000541.

Atkinson, H. J. and P. C. Babbitt (2009). "Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold." Biochemistry **48**(46): 11108-11116.

Axarli, I. A., D. J. Rigden, et al. (2004). "Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I." Biochem J **382**(Pt 3): 885-893.

Badejo, A. and M. Esaka (2010). Identification of Potential Gene Targets for the Improvement of Ascorbate Contents of Genetically Modified Plants. Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants. N. A. Anjum, M.-T. Chan and S. Umar, Springer Netherlands**:** 405-428.

Bagchi, M., M. Milnes, et al. (1999). "Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal injury in rats, and the protective ability of a novel grape seed proanthocyanidin extract." Nutrition Research **19**(8): 1189-1199.

Bahin, E., C. Bailly, et al. (2011). "Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley." Plant Cell Environ **34**(6): 980-993.

Balogh, L. M. and W. M. Atkins (2011). "Interactions of glutathione transferases with 4-hydroxynonenal." Drug Metab Rev **43**(2): 165-178.

Bandele, O. J., S. J. Clawson, et al. (2008). "Dietary polyphenols as topoisomerase II poisons: B ring and C ring substituents determine the mechanism of enzyme-mediated DNA cleavage enhancement." Chemical research in toxicology **21**(6): 1253-1260.

Barba-Espin, G., P. Diaz-Vivancos, et al. (2010). "Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings." Plant Cell Environ **33**(6): 981-994.

Barja, G. (2007). "Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies." Rejuvenation Res **10**(2): 215-224.

Barondeau, D. P., C. J. Kassmann, et al. (2004). "Nickel superoxide dismutase structure and mechanism." Biochemistry **43**(25): 8038-8047.

Bergeron, F., F. Auvre, et al. (2010). "HO* radicals induce an unexpected high proportion of tandem base lesions refractory to repair by DNA glycosylases." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(12): 5528-5533.

Bernhardt, R. (1996). "Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species." Rev Physiol Biochem Pharmacol **127**: 137-221.

Bethke, P. C. and R. L. Jones (2001). "Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species." The Plant journal : for cell and molecular biology **25**(1): 19-29.

Bhat, K. P., D. Lantvit, et al. (2001). "Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models." Cancer Res **61**(20): 7456-7463.

Blokhina, O., E. Virolainen, et al. (2003). "Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review." Ann Bot **91 Spec No**: 179-194.

Board, P. G. and M. W. Anders (2007). "Glutathione transferase omega 1 catalyzes the reduction of S-(phenacyl)glutathiones to acetophenones." Chemical research in toxicology **20**(1): 149-154.

Board, P. G., M. Coggan, et al. (2008). "S-(4-Nitrophenacyl)glutathione is a specific substrate for glutathione transferase omega 1-1." Anal Biochem **374**(1): 25-30.

Board, P. G., M. Coggan, et al. (2000). "Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases." The Journal of biological chemistry **275**(32): 24798-24806.

Bolton, J. L., M. A. Trush, et al. (2000). "Role of quinones in toxicology." Chemical research in toxicology **13**(3): 135-160.

Booth, J., E. Boyland, et al. (1961). "An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione." Biochem J **79**(3): 516-524.

Bourgaud, F., A. Hehn, et al. (2006). "Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes." Phytochemistry Reviews **5**(2-3): 293-308.

Bowler, C., M. V. Montagu, et al. (1992). "Superoxide Dismutase and Stress Tolerance." Annual review of plant physiology and plant molecular biology **43**(1): 83-116.

Braidot, E., E. Petrussa, et al. (1999). "Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates." FEBS Lett **451**(3): 347-350.

Brigelius-Flohe, R. (1999). "Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 951-965.

Bright, J., R. Desikan, et al. (2006). "ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H2O2 synthesis." Plant J **45**(1): 113-122.

Britton, G., S. Liaaen-Jensen, et al. (1995). Carotenoids. Basel ; Boston, Birkhäuser Verlag.

Brock, J., P. G. Board, et al. (2013). "Structural insights into omega-class glutathione transferases: a snapshot of enzyme reduction and identification of a non-catalytic ligandin site." PLoS One **8**(4): e60324.

Brooker, N. L., Y. Kuzimichev, et al. (2007). "Evaluation of coumarin derivatives as anti-fungal agents against soil-borne fungal pathogens." Commun Agric Appl Biol Sci **72**(4): 785-793.

Bruckner, V. and A. Szent-Györgyi (1936). "Chemical Nature of Citrin." Nature **138**(3503): 1057.

Brundin, A., J. H. Ratnayake, et al. (1982). "Glutathione-dependent reductive dehalogenation of 2,2',4'-trichloroacetophenone to 2',4'-dichloroacetophenone." Biochem Pharmacol **31**(23): 3885-3890.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris Cachan, Editions Tec & Doc ; Editions médicales internationales.

Bruns, C. M., I. Hubatsch, et al. (1999). "Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products." Journal of molecular biology **288**(3): 427-439.

Bu-Abbas, A., M. N. Clifford, et al. (1995). "Stimulation of rat hepatic UDP-glucuronosyl transferase activity following treatment with green tea." Food Chem Toxicol **33**(1): 27-30.

Buffinton, G. D., K. Ollinger, et al. (1989). "DT-diaphorase-catalysed reduction of 1,4-naphthoquinone derivatives and glutathionyl-quinone conjugates. Effect of substituents on autoxidation rates." Biochem J **257**(2): 561-571.

Burley, N. and C. B. Coopersmith (1987). "Bill Color Preferences of Zebra Finches." Ethology **76**(2): 133-151.

Burns, J. J. (1957). "Missing step in man, monkey and guinea pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid." Nature **180**(4585): 553.

Caccuri, A. M., G. Antonini, et al. (2002). "GSTB1-1 from Proteus mirabilis: a snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme." The Journal of biological chemistry **277**(21): 18777-18784.

Cadenas, E. (1989). "Biochemistry of oxygen toxicity." Annu Rev Biochem **58**: 79-110.

Cahoon, E. B., S. E. Hall, et al. (2003). "Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content." Nat Biotech **21**(9): 1082-1087.

Cahoon, E. B., S. E. Hall, et al. (2003). "Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content." Nature biotechnology **21**(9): 1082-1087.

Casley-Smith, J. R., R. G. Morgan, et al. (1993). "Treatment of lymphedema of the arms and legs with 5,6-benzo-[alpha]-pyrone." N Engl J Med **329**(16): 1158-1163.

Cazarolli, L. H., L. Zanatta, et al. (2008). "Flavonoids: prospective drug candidates." Mini Rev Med Chem **8**(13): 1429-1440.

Cazzonelli, C. I. (2011). "Carotenoids in nature: insights from plants and beyond." Functional Plant Biology **38**(11): 833-847.

Chatterjee, I. B. (1973). "Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid." Science **182**(4118): 1271-1272.

Chen, H. and M. R. Juchau (1998). "Recombinant human glutathione S-transferases catalyse enzymic isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in vitro." Biochem J **336 (Pt 1)**: 223-226.

Chou, H. H. and J. D. Keasling (2012). "Synthetic pathway for production of five-carbon alcohols from isopentenyl diphosphate." Appl Environ Microbiol **78**(22): 7849-7855.

Christianson, D. W. (2008). "Unearthing the roots of the terpenome." Curr Opin Chem Biol **12**(2): 141-150.

Coleman, J., M. Blake-Kalff, et al. (1997). "Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation." Trends in Plant Science **2**(4): 144-151.

Commenges, D., V. Scotet, et al. (2000). "Intake of flavonoids and risk of dementia." Eur J Epidemiol **16**(4): 357-363.

Conklin, P. L., E. H. Williams, et al. (1996). "Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9970-9974.

Corpas, F. J., J. B. Barroso, et al. (2001). "Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells." Trends Plant Sci **6**(4): 145-150.

Corpas, F. J., J. B. Barroso, et al. (2001). "Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells." Trends in Plant Science **6**(4): 145-150.

Coschigano, P. W. and B. Magasanik (1991). "The URE2 gene product of Saccharomyces cerevisiae plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases." Molecular and cellular biology **11**(2): 822-832.

Cunningham, F. X. and E. Gantt (1998). "Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants." Annual review of plant physiology and plant molecular biology **49**: 557-583.

Curini, M., G. Cravotto, et al. (2006). "Chemistry and biological activity of natural and synthetic prenyloxycoumarins." Curr Med Chem **13**(2): 199-222.

Cushnie, T. P. and A. J. Lamb (2005). "Antimicrobial activity of flavonoids." Int J Antimicrob Agents **26**(5): 343-356.

Cushnie, T. P. and A. J. Lamb (2011). "Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids." Int J Antimicrob Agents **38**(2): 99-107.

Czapski, G. (1984). "Reaction of .OH." Methods in enzymology **105**: 209-215.

Dall'Acqua, F., D. Vedaldi, et al. (1978). "THE PHOTOREACTION BETWEEN FUROCOUMARINS AND VARIOUS DNA WITH DIFFERENT BASE COMPOSITIONS." Photochemistry and Photobiology **27**(1): 33-36.

Danielsson, M., K. Lunden, et al. (2011). "Chemical and transcriptional responses of Norway spruce genotypes with different susceptibility to Heterobasidion spp. infection." BMC Plant Biol **11**: 154.

Dardalhon, M., B. de Massy, et al. (1998). "Mitotic recombination and localized DNA double-strand breaks are induced after 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in Saccharomyces cerevisiae." Curr Genet **34**(1): 30-42.

del Rio, L. A., L. M. Sandalio, et al. (2006). "Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling." Plant physiology **141**(2): 330-335.

Delaunay, A., A. D. Isnard, et al. (2000). "H2O2 sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor." EMBO J **19**(19): 5157-5166.

DeRidder, B. P., D. P. Dixon, et al. (2002). "Induction of glutathione S-transferases in Arabidopsis by herbicide safeners." Plant physiology **130**(3): 1497-1505.

Desikan, R., M. K. Cheung, et al. (2004). "ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells." J Exp Bot **55**(395): 205-212.

Desikan, R., A. H.-M. S, et al. (2001). "Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress." Plant Physiol **127**(1): 159-172.

Dickinson, D. A. and H. J. Forman (2002). "Cellular glutathione and thiols metabolism." Biochem Pharmacol **64**(5-6): 1019-1026.

Ding, Y., F. Ortelli, et al. (2003). "The Anopheles gambiae glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles." BMC Genomics **4**(1): 35.

Dirr, H., P. Reinemer, et al. (1994). "X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function." Eur J Biochem **220**(3): 645-661.

Dixon, D. P., D. J. Cole, et al. (2000). "Characterisation of a zeta class glutathione transferase from Arabidopsis thaliana with a putative role in tyrosine catabolism." Arch Biochem Biophys **384**(2): 407-412.

Dixon, D. P., B. G. Davis, et al. (2002). "Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in Arabidopsis thaliana." The Journal of biological chemistry **277**(34): 30859-30869.

Dixon, D. P. and R. Edwards (2009). "Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases." The Journal of biological chemistry **284**(32): 21249-21256.

Dixon, D. P. and R. Edwards (2010). "Glutathione transferases." Arabidopsis Book **8**: e0131.

Dixon, D. P. and R. Edwards (2010). "Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing." The Journal of biological chemistry **285**(47): 36322-36329.

Dixon, D. P., T. Hawkins, et al. (2009). "Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily." J Exp Bot **60**(4): 1207-1218.

Dixon, D. P., A. Lapthorn, et al. (2008). "Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases." The Journal of biological chemistry **283**(29): 20268-20276.

Dixon, D. P., J. D. Sellars, et al. (2011). "The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands." Biochem J **438**(1): 63-70.

Diz-Munoz, A., D. A. Fletcher, et al. (2013). "Use the force: membrane tension as an organizer of cell shape and motility." Trends Cell Biol **23**(2): 47-53.

Do, H., I. S. Kim, et al. (2014). "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of dehydroascorbate reductase (DHAR) from Oryza sativa L. japonica." Acta Crystallogr F Struct Biol Commun **70**(Pt 6): 781-785.

Dourado, D. F., P. A. Fernandes, et al. (2014). "Isomerization of Delta(5)-Androstene-3,17-dione into Delta(4)-Androstene-3,17-dione Catalyzed by Human Glutathione Transferase A3-3: A Computational Study Identifies a Dual Role for Glutathione." J Phys Chem A **118**(31): 5790-5800.

Drazkiewicz, M., E. Skorzynska-Polit, et al. (2004). "Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in Arabidopsis thaliana." Biometals **17**(4): 379-387.

Duff, I. F. and W. H. Shull (1949). "Fatal hemorrhage in dicumarol poisoning; with report of necropsy." J Am Med Assoc **139**(12): 762-766.

Emim, J. A. D. S., A. B. Oliveira, et al. (1994). "Pharmacological Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of a Citrus Bioflavonoid, Hesperidin, and the Isoflavonoids, Duartin and Claussequinone, in Rats and Mice." Journal of Pharmacy and Pharmacology **46**(2): 118-122.

Enayati, A. A., H. Ranson, et al. (2005). "Insect glutathione transferases and insecticide resistance." Insect Mol Biol **14**(1): 3-8.

Erben-Russ, M., W. Bors, et al. (1987). "Reactions of linoleic acid peroxyl radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **52**(3): 393-412.

Eskling, M. and H.-E. Åkerlund (1998). "Changes in the quantities of violaxanthin de-epoxidase, xanthophylls and ascorbate in spinach upon shift from low to high light." Photosynthesis Research **57**(1): 41-50.

Evans, D. C. and T. A. Baillie (2005). "Minimizing the potential for metabolic activation as an integral part of drug design." Curr Opin Drug Discov Devel **8**(1): 44-50.

Fang, T., D. F. Li, et al. (2011). "Identification and clarification of the role of key active site residues in bacterial glutathione S-transferase zeta/maleylpyruvate isomerase." Biochem Biophys Res Commun **410**(3): 452-456.

Farinola, N. and N. Piller (2005). "Pharmacogenomics: its role in re-establishing coumarin as treatment for lymphedema." Lymphat Res Biol **3**(2): 81-86.

Favier, A. (2003). "Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique." L'actualité Chimique **269-270**: 108-115.

Ferguson, A. D., B. M. McKeever, et al. (2007). "Crystal structure of inhibitor-bound human 5-lipoxygenase-activating protein." Science **317**(5837): 510-512.

Fernandez-Canon, J. M., M. W. Baetscher, et al. (2002). "Maleylacetoacetate isomerase (MAAI/GSTZ)-deficient mice reveal a glutathione-dependent nonenzymatic bypass in tyrosine catabolism." Molecular and cellular biology **22**(13): 4943-4951.

Foreman, J., V. Demidchik, et al. (2003). "Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth." Nature **422**(6930): 442-446.

Forti, G. and G. Elli (1995). "The Function of Ascorbic Acid in Photosynthetic Phosphorylation." Plant physiology **109**(4): 1207-1211.

Foyer, C., J. Rowell, et al. (1983). "Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination." Planta **157**(3): 239-244.

Foyer, C. H. and B. Halliwell (1976). "The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism." Planta **133**(1): 21-25.

Foyer, C. H., M. Lelandais, et al. (1994). "Photooxidative stress in plants." Physiologia Plantarum **92**(4): 696-717.

Foyer, C. H. and G. Noctor (2005). "Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses." Plant Cell **17**(7): 1866-1875.

Foyer, C. H. and G. Noctor (2013). "Redox signaling in plants." Antioxid Redox Signal **18**(16): 2087-2090.

Fraga, C. G., M. Galleano, et al. (2010). "Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols." Mol Aspects Med **31**(6): 435-445.

Franceschi, V. R., P. Krokene, et al. (2005). "Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests." New Phytol **167**(2): 353-375.

Fremont, L. (2000). "Biological effects of resveratrol." Life Sci **66**(8): 663-673.

Freschet, G. T., J. T. Weedon, et al. (2012). "Interspecific differences in wood decay rates: insights from a new short-term method to study long-term wood decomposition." Journal of Ecology **100**(1): 161-170.

Fridovich, I. (1986). "Superoxide dismutases." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **58**: 61-97.

Friedman, M. (2007). "Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas." Mol Nutr Food Res **51**(1): 116-134.

Frova, C. (2006). "Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives." Biomolecular engineering **23**(4): 149-169.

Fryer, M. J. (1992). "The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α-tocopherol)." Plant, Cell & Environment **15**(4): 381-392.

Fuhrman, B., A. Lavy, et al. (1995). "Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation." Am J Clin Nutr **61**(3): 549-554.

Fulbert, J. C. and M. J. Cals (1992). "[Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms]." Pathol Biol (Paris) **40**(1): 66-77.

Funk, C. D. (2001). "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." Science **294**(5548): 1871-1875.

Fyfe, P. K., G. D. Westrop, et al. (2012). "Leishmania TDR1 structure, a unique trimeric glutathione transferase capable of deglutathionylation and antimonial prodrug activation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(29): 11693-11698.

Gacche, R. N., D. S. Gond, et al. (2006). "Coumarin Schiff-bases: as antioxidant and possibly anti-inflammatory agents." J Enzyme Inhib Med Chem **21**(2): 157-161.

Galati, E. M., M. T. Monforte, et al. (1994). "Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity." Farmaco **40**(11): 709-712.

Galleano, M., S. V. Verstraeten, et al. (2010). "Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis." Arch Biochem Biophys **501**(1): 23-30.

Gao, Q. and L. Zhang (2008). "Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient vtc1 mutants of Arabidopsis thaliana." J Plant Physiol **165**(2): 138-148.

Gemes, K., P. Poor, et al. (2011). "Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity." Physiol Plant **142**(2): 179-192.

Ghezzi, P. and V. Bonetto (2003). "Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins." Proteomics **3**(7): 1145-1153.

Gill, S. S. and N. Tuteja (2010). "Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants." Plant Physiol Biochem **48**(12): 909-930.

Giuliano, G., R. Tavazza, et al. (2008). "Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants." Trends Biotechnol **26**(3): 139-145.

González-Pérez, S., J. Gutiérrez, et al. (2011). "Early Transcriptional Defense Responses in Arabidopsis Cell Suspension Culture under High-Light Conditions." Plant physiology **156**(3): 1439-1456.

Goodwin, T. W. (1980). The biochemistry of the carotenoids. London ; New York, Chapman and Hall.

Gorman, A. A. and M. A. Rodgers (1992). "Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments." J Photochem Photobiol B **14**(3): 159-176.

Gray, D. A. (1996). "Carotenoids and sexual dichromatism in North American passerine birds." American Naturalist: 453-480.

Green, A. R., R. P. Hayes, et al. (2012). "Structural understanding of the glutathione-dependent reduction mechanism of glutathionyl-hydroquinone reductases." The Journal of biological chemistry **287**(43): 35838-35848.

Greenhagen, B. and J. Chappell (2001). "Molecular scaffolds for chemical wizardry: learning nature's rules for terpene cyclases." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13479-13481.

Grill, E., S. Loffler, et al. (1989). "Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(18): 6838-6842.

Gyuris, J., E. Golemis, et al. (1993). "Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2." Cell **75**(4): 791-803.

Haber, F. and J. Weiss (1932). "Über die Katalyse des Hydroperoxydes." Naturwissenschaften **20**(51): 948-950.

Habig, W. H., M. J. Pabst, et al. (1974). "The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(10): 3879-3882.

Habig, W. H., M. J. Pabst, et al. (1974). "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." The Journal of biological chemistry **249**(22): 7130-7139.

Hadacek, F., C. Muller, et al. (1994). "Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives fromPeucedanum (Apiaceae: Apioideae)." J Chem Ecol **20**(8): 2035-2054.

Hagglund, P., J. Bunkenborg, et al. (2008). "Identification of thioredoxin disulfide targets using a quantitative proteomics approach based on isotope-coded affinity tags." J Proteome Res **7**(12): 5270-5276.

Halliwell, B. (1977). "Generation of the superoxide radical during the peroxidatic oxidation of NADH by catalase at acid pH values." FEBS Lett **80**(2): 291-293.

Halliwell, B. (2006). "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." Plant physiology **141**(2): 312-322.

Hammond-Kosack, K. E. and J. D. Jones (1996). "Resistance gene-dependent plant defense responses." Plant Cell **8**(10): 1773-1791.

Hansson, L. O., M. Widersten, et al. (1999). "An approach to optimizing the active site in a glutathione transferase by evolution in vitro." Biochem J **344 Pt 1**: 93-100.

Harborne, J. B. (1999). "Recent advances in chemical ecology." Nat Prod Rep **16**(4): 509-523.

Harms, H., D. Schlosser, et al. (2011). "Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals." Nature reviews. Microbiology **9**(3): 177-192.

Hartwig, U. A., C. M. Joseph, et al. (1991). "Flavonoids Released Naturally from Alfalfa Seeds Enhance Growth Rate of Rhizobium meliloti." Plant Physiol **95**(3): 797-803.

Hausladen, A. and K. J. Kunert (1990). "Effects of artificially enhanced levels of ascorbate and glutathione on the enzymes monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase, and glutathione reductase in spinach (Spinacia oleracea)." Physiologia Plantarum **79**(2): 384-388.

Hayashi, S., E. Tajkhorshid, et al. "Molecular Dynamics Simulation of Bacteriorhodopsin's Photoisomerization Using Ab Initio Forces for the Excited Chromophore." Biophysical Journal **85**(3): 1440-1449.

Hayes, J. D., J. U. Flanagan, et al. (2005). "Glutathione transferases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **45**: 51-88.

Heber, U., C. Miyake, et al. (1996). "Monodehydroascorbate Radical Detected by Electron Paramagnetic Resonance Spectrometry Is a Sensitive Probe of Oxidative Stress in Intact Leaves." Plant and Cell Physiology **37**(8): 1066-1072.

Heller, W., G. Forkmann, et al. (1994). "The flavonoids: Advances in research since 1986." Secondary plant products. Encyclopedia of plant physiology, ed. by JB Harborne (Chapman & Hall, London, 1993): 399.

Hemingway, J. (2000). "The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance." Insect Biochem Mol Biol **30**(11): 1009-1015.

Hemingway, J., N. J. Hawkes, et al. (2004). "The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes." Insect Biochem Mol Biol **34**(7): 653-665.

Henderson, C. J., A. W. McLaren, et al. (1998). "Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function." Chem Biol Interact **111-112**: 69-82.

Henderson, C. J., A. G. Smith, et al. (1998). "Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5275-5280.

Henegouwen, V., G. M. Beijersbergen, et al. (1989). "A method for the determination of PUVA-induced *in vivo* irreversible binding of 8-methoxypsoralen (8-MOP) to epidermal lipids, proteins and DNA/RNA." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **3**(4): 631-635.

Herschbach, C. and H. Rennenberg (1991). "Influence of Glutathione (GSH) on Sulphate Influx, Xylem Loading and Exudation in Excised Tobacco Roots." Journal of Experimental Botany **42**(8): 1021-1029.

Hill, B. A., H. E. Kleiner, et al. (1993). "Identification of multi-S-substituted conjugates of hydroquinone by HPLC-coulometric electrode array analysis and mass spectroscopy." Chemical research in toxicology **6**(4): 459-469.

Hill, G. E. (1991). "Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality." Nature **350**(6316): 337-339.

Hoerr, R. and M. Noeldner (2002). "Ensaculin (KA-672 HCl): a multitransmitter approach to dementia treatment." CNS Drug Rev **8**(2): 143-158.

Hojo, M., K. Toga, et al. (2011). "High-level expression of the Geranylgeranyl diphosphate synthase gene in the frontal gland of soldiers in Reticulitermes speratus (Isoptera: Rhinotermitidae)." Archives of Insect Biochemistry and Physiology **77**(1): 17-31.

Holford, N. H. (1986). "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin. Understanding the dose-effect relationship." Clin Pharmacokinet **11**(6): 483-504.

Hollander-Czytko, H., J. Grabowski, et al. (2005). "Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in Arabidopsis under stress conditions." J Plant Physiol **162**(7): 767-770.

Holm, P. J., P. Bhakat, et al. (2006). "Structural basis for detoxification and oxidative stress protection in membranes." Journal of molecular biology **360**(5): 934-945.

Horemans, N., C. H. Foyer, et al. (2000). "Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane." Trends Plant Sci **5**(6): 263-267.

Hoult, J. R. and M. Paya (1996). "Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential." Gen Pharmacol **27**(4): 713-722.

Hu, X., X. Ji, et al. (1997). "Mechanism of differential catalytic efficiency of two polymorphic forms of human glutathione S-transferase P1-1 in the glutathione conjugation of carcinogenic diol epoxide of chrysene." Arch Biochem Biophys **345**(1): 32-38.

Hu, X., S. J. Neill, et al. (2009). "Fungal elicitor Pep-25 increases cytosolic calcium ions, H2O2 production and activates the octadecanoid pathway in Arabidopsis thaliana." Planta **229**(6): 1201-1208.

Hu, X. and S. V. Singh (1997). "Differential catalytic efficiency and enantioselectivity of murine glutathione S-transferase isoenzymes in the glutathione conjugation of carcinogenic anti-diol epoxides of chrysene and benzo(g)chrysene." Arch Biochem Biophys **345**(2): 318-324.

Hu, X., H. Xia, et al. (1997). "Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons." Biochem Biophys Res Commun **238**(2): 397-402.

Huang, C., W. He, et al. (2005). "Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient Arabidopsis mutant." J Exp Bot **56**(422): 3041-3049.

Huang, W. Y., Y. Z. Cai, et al. (2010). "Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention." Nutr Cancer **62**(1): 1-20.

Huang, Y., R. Xun, et al. (2008). "Maintenance role of a glutathionyl-hydroquinone lyase (PcpF) in pentachlorophenol degradation by Sphingobium chlorophenolicum ATCC 39723." J Bacteriol **190**(23): 7595-7600.

Hubatsch, I., M. Ridderstrom, et al. (1998). "Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation." Biochem J **330 (Pt 1)**: 175-179.

Hudler, G. W. (1998). Magical Mushrooms, Mischievous Moulds: The Remarkable Story of the Fungus Kingdom and Its Impact on Human Affairs, Princeton University Press.

Hung, K. T. and C. H. Kao (2007). "The participation of hydrogen peroxide in methyl jasmonate-induced NH4+ accumulation in rice leaves." Journal of Plant Physiology **164**(11): 1469-1479.

Hurst, R., Y. Bao, et al. (1998). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases." Biochem J **332 (Pt 1)**: 97-100.

Iacopini, P., M. Baldi, et al. (2008). "Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions." Journal of Food Composition and Analysis **21**(8): 589-598.

Imlay, J. A. (2003). "Pathways of oxidative damage." Annu Rev Microbiol **57**: 395-418.

Imlay, J. A. and S. Linn (1988). "DNA damage and oxygen radical toxicity." Science **240**(4857): 1302-1309.

Ishikawa, T., A. F. Casini, et al. (1998). "Molecular cloning and functional expression of rat liver glutathione-dependent dehydroascorbate reductase." The Journal of biological chemistry **273**(44): 28708-28712.

Ishikawa, T., Z. S. Li, et al. (1997). "The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function, and gene expression." Biosci Rep **17**(2): 189-207.

Ivanov, B. and S. Khorobrykh (2003). "Participation of photosynthetic electron transport in production and scavenging of reactive oxygen species." Antioxid Redox Signal **5**(1): 43-53.

Izzi, V., L. Masuelli, et al. (2012). "The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks." Front Biosci (Landmark Ed) **17**: 2396-2418.

Jacquot, J. P., K. J. Dietz, et al. (2013). Redox Regulation in Plants: Glutathione and “Redoxin” Related Families. Oxidative Stress and Redox Regulation, Springer Netherlands**:** 213-231.

Jakobsson, P. J., R. Morgenstern, et al. (1999). "Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism." Protein Sci **8**(3): 689-692.

Jang, M., L. Cai, et al. (1997). "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes." Science **275**(5297): 218-220.

Jannat, R., M. Uraji, et al. (2011). "Roles of intracellular hydrogen peroxide accumulation in abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells." J Plant Physiol **168**(16): 1919-1926.

Ji, X., E. C. von Rosenvinge, et al. (1996). "Location of a potential transport binding site in a sigma class glutathione transferase by x-ray crystallography." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8208-8213.

Johansson, A. S. and B. Mannervik (2001). "Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones." The Journal of biological chemistry **276**(35): 33061-33065.

Joo, J. H., Y. S. Bae, et al. (2001). "Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism." Plant physiology **126**(3): 1055-1060.

Jowsey, I. R., A. M. Thomson, et al. (2001). "Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases." Biochem J **359**(Pt 3): 507-516.

Joyce, S. A., A. O. Brachmann, et al. (2008). "Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene." Angew Chem Int Ed Engl **47**(10): 1942-1945.

Kamal-Eldin, A. and L. A. Appelqvist (1996). "The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols." Lipids **31**(7): 671-701.

Kamisaka, K., W. H. Habig, et al. (1975). "Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin." Eur J Biochem **60**(1): 153-161.

Kasai, H. (1997). "Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis." Mutat Res **387**(3): 147-163.

Kato, H., D. Takemoto, et al. (2013). "Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in potato plant." Physiol Plant **148**(3): 371-386.

Kato, R., T. Nakadate, et al. (1983). "Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition." Carcinogenesis **4**(10): 1301-1305.

Kelly, V. P., E. M. Ellis, et al. (2000). "Chemoprevention of Aflatoxin B1 Hepatocarcinogenesis by Coumarin, a Natural Benzopyrone That Is a Potent Inducer of Aflatoxin B1-Aldehyde Reductase, the Glutathione S-Transferase A5 and P1 Subunits, and NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase in Rat Liver." Cancer Research **60**(4): 957-969.

Keppler, D. (1999). "Export pumps for glutathione S-conjugates." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 985-991.

Ketterer, B., B. Coles, et al. (1983). "The role of glutathione in detoxication." Environ Health Perspect **49**: 59-69.

Khan, A. U. and M. Kasha (1994). "Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12365-12367.

Kim, S. H., K. A. Kang, et al. (2008). "Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species." Acta Pharmacol Sin **29**(11): 1319-1326.

Kitagawa, Y., N. Tanaka, et al. (1991). "Three-dimensional structure of Cu,Zn-superoxide dismutase from spinach at 2.0 A resolution." J Biochem **109**(3): 477-485.

Kliebenstein, D. J., R. A. Monde, et al. (1998). "Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization." Plant Physiol **118**(2): 637-650.

Kochian, L. V., O. A. Hoekenga, et al. (2004). "How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency." Annu Rev Plant Biol **55**: 459-493.

Kodan, A., H. Kuroda, et al. (2002). "A stilbene synthase from Japanese red pine (Pinus densiflora): implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3335-3339.

Kode, A., S. Rajendrasozhan, et al. (2008). "Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(3): L478-488.

Kolm, R. H., G. E. Sroga, et al. (1992). "Participation of the phenolic hydroxyl group of Tyr-8 in the catalytic mechanism of human glutathione transferase P1-1." Biochem J **285 (Pt 2)**: 537-540.

Kong, K. H., M. Nishida, et al. (1992). "Tyrosine-7 is an essential residue for the catalytic activity of human class PI glutathione S-transferase: chemical modification and site-directed mutagenesis studies." Biochem Biophys Res Commun **182**(3): 1122-1129.

Kostova, I., S. Bhatia, et al. (2011). "Coumarins as antioxidants." Curr Med Chem **18**(25): 3929-3951.

Kovacs, A., P. Forgo, et al. (2007). "Phenanthrenes and a dihydrophenanthrene from Tamus communis and their cytotoxic activity." Phytochemistry **68**(5): 687-691.

Kovacs, A., A. Vasas, et al. (2008). "Natural phenanthrenes and their biological activity." Phytochemistry **69**(5): 1084-1110.

Kovtun, Y., W. L. Chiu, et al. (2000). "Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2940-2945.

Krasensky, J. and C. Jonak (2012). "Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks." J Exp Bot **63**(4): 1593-1608.

Krieger-Liszkay, A. (2005). "Singlet oxygen production in photosynthesis." J Exp Bot **56**(411): 337-346.

Krieger-Liszkay, A., C. Fufezan, et al. (2008). "Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism." Photosynth Res **98**(1-3): 551-564.

Kristensen, B. K., P. Askerlund, et al. (2004). "Identification of oxidised proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Phytochemistry **65**(12): 1839-1851.

Kruk, J., H. Hollander-Czytko, et al. (2005). "Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II." J Plant Physiol **162**(7): 749-757.

Kwon, J. Y., S. G. Seo, et al. (2012). "Piceatannol, natural polyphenolic stilbene, inhibits adipogenesis via modulation of mitotic clonal expansion and insulin receptor-dependent insulin signaling in early phase of differentiation." The Journal of biological chemistry **287**(14): 11566-11578.

Labrou, N. E., L. V. Mello, et al. (2001). "Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (Zea mays) glutathione S-transferase I." Biochem J **358**(Pt 1): 101-110.

Ladner, J. E., J. F. Parsons, et al. (2004). "Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1." Biochemistry **43**(2): 352-361.

Lake, B. G., J. G. Evans, et al. (2002). "Studies on the disposition, metabolism and hepatotoxicity of coumarin in the rat and Syrian hamster." Food and Chemical Toxicology **40**(6): 809-823.

Lam, B. K. and K. F. Austen (2002). "Leukotriene C4 synthase: a pivotal enzyme in cellular biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes." Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**: 511-520.

Lamoureux, G. L., R. H. Shimabukuro, et al. (1970). "Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections." J Agric Food Chem **18**(1): 81-86.

Lan, T., Z. L. Yang, et al. (2009). "Extensive functional diversification of the Populus glutathione S-transferase supergene family." The Plant cell **21**(12): 3749-3766.

Lappartient, A. G. and B. Touraine (1996). "Demand-Driven Control of Root ATP Sulfurylase Activity and SO42- Uptake in Intact Canola (The Role of Phloem-Translocated Glutathione)." Plant Physiol **111**(1): 147-157.

Latowski, D., E. Surówka, et al. (2010). Regulatory Role of Components of Ascorbate–Glutathione Pathway in Plant Stress Tolerance. Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants. N. A. Anjum, M.-T. Chan and S. Umar, Springer Netherlands**:** 1-53.

Lee, S. K., H. J. Lee, et al. (2005). "Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine." Fitoterapia **76**(2): 258-260.

Lesser, M. P. (2006). "Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology." Annu Rev Physiol **68**: 253-278.

Liebler, D. C., D. S. Kling, et al. (1986). "Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione." The Journal of biological chemistry **261**(26): 12114-12119.

Limasset, B., C. le Doucen, et al. (1993). "Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. Multivariate analysis of structure-activity relationships (SAR)." Biochem Pharmacol **46**(7): 1257-1271.

Linster, C. L. and E. Van Schaftingen (2006). "Glucuronate, the precursor of vitamin C, is directly formed from UDP-glucuronate in liver." FEBS J **273**(7): 1516-1527.

Litwack, G., B. Ketterer, et al. (1971). "Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions." Nature **234**(5330): 466-467.

Liu, G. Y., A. Essex, et al. (2005). "Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity." J Exp Med **202**(2): 209-215.

Liu, H.-W. (2011). Extraction and Isolation of Compounds from Herbal Medicines. Traditional Herbal Medicine Research Methods, John Wiley & Sons, Inc.**:** 81-138.

Liu, Y. J., X. M. Han, et al. (2013). "Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in Physcomitrella patens reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants." Plant physiology **161**(2): 773-786.

Lopez-Gallego, F., S. A. Agger, et al. (2010). "Sesquiterpene synthases Cop4 and Cop6 from Coprinus cinereus: catalytic promiscuity and cyclization of farnesyl pyrophosphate geometric isomers." Chembiochem **11**(8): 1093-1106.

Loyall, L., K. Uchida, et al. (2000). "Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures." Plant Cell **12**(10): 1939-1950.

Lu, S. C. (2000). "Regulation of glutathione synthesis." Curr Top Cell Regul **36**: 95-116.

Ma, L., H. Zhang, et al. (2012). "NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na(+)/K(+)homeostasis in Arabidopsis under salt stress." J Exp Bot **63**(1): 305-317.

Macheix, J. J., A. Fleuriet, et al. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Presses polytechniques et universitaires romandes.

MacManus-Spencer, L. A. and K. McNeill (2005). "Quantification of Singlet Oxygen Production in the Reaction of Superoxide with Hydrogen Peroxide Using a Selective Chemiluminescent Probe." Journal of the American Chemical Society **127**(25): 8954-8955.

Magiri, E. N., V. N. Konji, et al. (1995). "Effect of plant quinones on insect flight muscle mitochondria." International Journal of Tropical Insect Science **16**(02): 183-189.

Mahmood, N., C. Pizza, et al. (1993). "Inhibition of HIV infection by flavanoids." Antiviral Res **22**(2-3): 189-199.

Marchand, C., P. Le Marechal, et al. (2006). "Comparative proteomic approaches for the isolation of proteins interacting with thioredoxin." Proteomics **6**(24): 6528-6537.

Marchand, C., P. Le Marechal, et al. (2004). "New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis." Proteomics **4**(9): 2696-2706.

Marnett, L. J. (1999). "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde." Mutat Res **424**(1-2): 83-95.

Marrs, K. A. (1996). "The Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants." Annual review of plant physiology and plant molecular biology **47**: 127-158.

Marsh, M., D. K. Shoemark, et al. (2008). "Structure of bacterial glutathione-S-transferase maleyl pyruvate isomerase and implications for mechanism of isomerisation." Journal of molecular biology **384**(1): 165-177.

Martinez-Micaelo, N., N. Gonzalez-Abuin, et al. (2012). "Procyanidins and inflammation: molecular targets and health implications." Biofactors **38**(4): 257-265.

Martinez Molina, D., A. Wetterholm, et al. (2007). "Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase." Nature **448**(7153): 613-616.

Masai, E., A. Ichimura, et al. (2003). "Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether." J Bacteriol **185**(6): 1768-1775.

Mathieu, Y., P. Prosper, et al. (2012). "Characterization of a Phanerochaete chrysosporium glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties." The Journal of biological chemistry **287**(46): 39001-39011.

Mathieu, Y., P. Prosper, et al. (2013). "Diversification of fungal specific class a glutathione transferases in saprotrophic fungi." PLoS One **8**(11): e80298.

May, M. J., T. Vernoux, et al. (1998). "Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development." Journal of Experimental Botany **49**(321): 649-667.

McCloud, E. S., M. R. Berenbaum, et al. (1992). "Furanocoumarin content and phototoxicity of rough lemon (Citrus jambhiri) foliage exposed to enhanced ultraviolet-B (UVB) irradiation." J Chem Ecol **18**(7): 1125-1137.

McClung, C. R. (1997). "Regulation of catalases in Arabidopsis." Free Radic Biol Med **23**(3): 489-496.

McGarvey, D. J. and R. Croteau (1995). "Terpenoid metabolism." Plant Cell **7**(7): 1015-1026.

McTigue, M. A., D. R. Williams, et al. (1995). "Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from Schistosoma japonica and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel." Journal of molecular biology **246**(1): 21-27.

Meux, E., M. Morel, et al. (2013). "New substrates and activity of Phanerochaete chrysosporium Omega glutathione transferases." Biochimie **95**(2): 336-346.

Meux, E., P. Prosper, et al. (2011). "Glutathione transferases of Phanerochaete chrysosporium: S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class." The Journal of biological chemistry **286**(11): 9162-9173.

Mhamdi, A., G. Noctor, et al. (2012). "Plant catalases: peroxisomal redox guardians." Arch Biochem Biophys **525**(2): 181-194.

Mikstacka, R., A. M. Rimando, et al. (2006). "Effect of natural analogues of trans-resveratrol on cytochromes P4501A2 and 2E1 catalytic activities." Xenobiotica **36**(4): 269-285.

Miller, G., V. Shulaev, et al. (2008). "Reactive oxygen signaling and abiotic stress." Physiol Plant **133**(3): 481-489.

Mitchell, A. E., J. Lakritz, et al. (2000). "Quantification of individual glutathione S-transferase isozymes in hepatic and pulmonary tissues of naphthalene-tolerant mice." Arch Toxicol **74**(4-5): 215-221.

Mittler, R., S. Vanderauwera, et al. (2004). "Reactive oxygen gene network of plants." Trends Plant Sci **9**(10): 490-498.

Miura, K. and Y. Tada (2014). "Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid." Front Plant Sci **5**: 4.

Miura, T., Y. Shinkai, et al. (2011). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a quinone reductase in the suppression of 1,2-naphthoquinone protein adduct formation." Free Radic Biol Med **51**(11): 2082-2089.

Mobh, S. (1939). "RESEARCH FOR VITAMIN P." Journal of Biochemistry **29**(3): 487-501.

Moller, I. M., P. E. Jensen, et al. (2007). "Oxidative modifications to cellular components in plants." Annu Rev Plant Biol **58**: 459-481.

Moller, I. M. and B. K. Kristensen (2006). "Protein oxidation in plant mitochondria detected as oxidized tryptophan." Free Radic Biol Med **40**(3): 430-435.

Monks, T. J., R. P. Hanzlik, et al. (1992). "Quinone chemistry and toxicity." Toxicol Appl Pharmacol **112**(1): 2-16.

Montagner, C., S. M. de Souza, et al. (2008). "Antifungal activity of coumarins." Z Naturforsch C **63**(1-2): 21-28.

Morel, F., C. Rauch, et al. (2002). "The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter." Pharmacogenetics **12**(4): 277-286.

Morel, M., E. Meux, et al. (2013). "Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi." Microb Biotechnol **6**(3): 248-263.

Morgenstern, R., C. Guthenberg, et al. (1982). "Purification of microsomal glutathione S-transferase." Acta Chem Scand B **36**(4): 257-259.

Mori, K. (2000). "Organic synthesis and chemical ecology." Acc Chem Res **33**(2): 102-110.

Mucsi, I. and B. M. Pragai (1985). "Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids." Experientia **41**(7): 930-931.

Mueller, L. A., C. D. Goodman, et al. (2000). "AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein." Plant physiology **123**(4): 1561-1570.

Mullineaux, P. and S. Karpinski (2002). "Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast." Curr Opin Plant Biol **5**(1): 43-48.

Murphy, R. C. and S. Zarini (2002). "Glutathione adducts of oxyeicosanoids." Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**: 471-482.

Murray, R. H. (2002). The Naturally Occurring Coumarins. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby and R. E. Moore, Springer Vienna. **83:** 1-619.

Nakano, R., H. Ishida, et al. (2006). "In vivo fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions." Plant Cell Physiol **47**(2): 270-276.

Navas, P., J. Villalba, et al. (1994). "Ascorbate function at the plasma membrane." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes **1197**(1): 1-13.

Navrot, N., V. Collin, et al. (2006). "Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses." Plant physiology **142**(4): 1364-1379.

Neill, S., R. Desikan, et al. (2002). "Hydrogen peroxide signalling." Current Opinion in Plant Biology **5**(5): 388-395.

Niegowski, D., T. Kleinschmidt, et al. (2014). "Crystal structures of leukotriene C4 synthase in complex with product analogs: implications for the enzyme mechanism." The Journal of biological chemistry **289**(8): 5199-5207.

Nijhoff, W. A., M. A. Bosboom, et al. (1995). "Enhancement of rat hepatic and gastrointestinal glutathione and glutathione S-transferases by alpha-angelicalactone and flavone." Carcinogenesis **16**(3): 607-612.

Nishino, H., E. Naitoh, et al. (1984). "Quercetin interacts with calmodulin, a calcium regulatory protein." Experientia **40**(2): 184-185.

Nishiyama, T., T. Ohnuma, et al. (2008). "UDP-glucuronosyltransferases 1A6 and 1A10 catalyze reduced menadione glucuronidation." Biochem Biophys Res Commun **371**(2): 247-250.

Noctor, G., A.-C. M. Arisi, et al. (1998). "Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants." Journal of Experimental Botany **49**(321): 623-647.

Noctor, G. and C. H. Foyer (1998). "ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control." Annual review of plant physiology and plant molecular biology **49**: 249-279.

Norton, G. J., D. E. Lou-Hing, et al. (2008). "Rice-arsenate interactions in hydroponics: whole genome transcriptional analysis." J Exp Bot **59**(8): 2267-2276.

Nounjan, N., P. T. Nghia, et al. (2012). "Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes." J Plant Physiol **169**(6): 596-604.

Oakley, A. J., M. Lo Bello, et al. (1999). "The ligandin (non-substrate) binding site of human pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site)." Journal of molecular biology **291**(4): 913-926.

Ogawa, K. i., S. Kanematsu, et al. (1995). "Attachment of CuZn-Superoxide Dismutase to Thylakoid Membranes at the Site of Superoxide Generation (PSI) in Spinach Chloroplasts: Detection by Immuno-Gold Labeling After Rapid Freezing and Substitution Method." Plant and Cell Physiology **36**(4): 565-573.

Oleinick, N. L., S. M. Chiu, et al. (1987). "The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells." Br J Cancer Suppl **8**: 135-140.

Orozco-Cardenas, M. L., J. Narvaez-Vasquez, et al. (2001). "Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate." Plant Cell **13**(1): 179-191.

Padayatty, S. J., A. Katz, et al. (2003). "Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention." J Am Coll Nutr **22**(1): 18-35.

Padh, H. (1990). "Cellular functions of ascorbic acid." Biochem Cell Biol **68**(10): 1166-1173.

Pan, M. H., C. S. Lai, et al. (2010). "Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids." Food Funct **1**(1): 15-31.

Pari, L. and M. A. Satheesh (2006). "Effect of pterostilbene on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin- and nicotinamide-induced diabetic rats." Life Sci **79**(7): 641-645.

Park, S. J., F. Ahmad, et al. (2012). "Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases." Cell **148**(3): 421-433.

Paul, V. J. (1992). Ecological roles of marine natural products. Ithaca, N.Y., Comstock Pub. Associates.

Pawlik-Skowronska, B., J. Pirszel, et al. (2007). "Concentrations of phytochelatins and glutathione found in natural assemblages of seaweeds depend on species and metal concentrations of the habitat." Aquat Toxicol **83**(3): 190-199.

Pemble, S. E. and J. B. Taylor (1992). "An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences." Biochem J **287 (Pt 3)**: 957-963.

Pemble, S. E., A. F. Wardle, et al. (1996). "Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue." Biochem J **319 (Pt 3)**: 749-754.

Pena-Ahumada, A., U. Kahmann, et al. (2006). "Regulation of peroxiredoxin expression versus expression of Halliwell-Asada-Cycle enzymes during early seedling development of Arabidopsis thaliana." Photosynth Res **89**(2-3): 99-112.

Penninckx, M. J. (2002). "An overview on glutathione in Saccharomyces versus non-conventional yeasts." FEMS Yeast Res **2**(3): 295-305.

Peralta-Yahya, P. P., F. Zhang, et al. (2012). "Microbial engineering for the production of advanced biofuels." Nature **488**(7411): 320-328.

Perecko, T., V. Jancinova, et al. (2008). "Structure-efficiency relationship in derivatives of stilbene. Comparison of resveratrol, pinosylvin and pterostilbene." Neuro Endocrinol Lett **29**(5): 802-805.

Perovic, A., A. Unic, et al. (2014). "Recreational scuba diving: negative or positive effects of oxidative and cardiovascular stress? FAU - Perovic, Antonija FAU - Unic, Adriana FAU - Dumic, Jerka." biochem **24**(2): 235-247.

Petras, T., W. G. Siems, et al. (1995). "4-hydroxynonenal is degraded to mercapturic acid conjugate in rat kidney." Free Radic Biol Med **19**(5): 685-688.

Piromjitpong, J., J. Wongsantichon, et al. (2007). "Differences in the subunit interface residues of alternatively spliced glutathione transferases affects catalytic and structural functions." Biochem J **401**(3): 635-644.

Pocsi, I., R. A. Prade, et al. (2004). "Glutathione, altruistic metabolite in fungi." Adv Microb Physiol **49**: 1-76.

Potters, G., L. De Gara, et al. (2002). "Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?" Plant Physiology and Biochemistry **40**(6–8): 537-548.

Pryor, W. A. and J. P. Stanley (1975). "Suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation." The Journal of Organic Chemistry **40**(24): 3615-3617.

Puntarulo, S., R. A. Sanchez, et al. (1988). "Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination." Plant physiology **86**(2): 626-630.

Quin, M. B., C. M. Flynn, et al. (2014). "Traversing the fungal terpenome." Natural Product Reports **31**(10): 1449-1473.

Raffalli-Mathieu, F. and B. Mannervik (2005). "Human glutathione transferase A3-3 active as steroid double-bond isomerase." Methods in enzymology **401**: 265-278.

Ranson, H., L. Rossiter, et al. (2001). "Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector Anopheles gambiae." Biochem J **359**(Pt 2): 295-304.

Raucher, D. and M. P. Sheetz (2000). "Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension." J Cell Biol **148**(1): 127-136.

Rautenkranz, A., L. Li, et al. (1994). "Transport of Ascorbic and Dehydroascorbic Acids across Protoplast and Vacuole Membranes Isolated from Barley (Hordeum vulgare L. cv Gerbel) Leaves." Plant Physiol **106**(1): 187-193.

Rawls, H. R. and P. J. van Santen (1970). "SINGLET OXYGEN: A POSSIBLE SOURCE OF THE ORIGINAL HYDROPEROXIDES IN FATTY ACIDS." Annals of the New York Academy of Sciences **171**(1): 135-137.

Read, M. A. (1995). "Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents." Am J Pathol **147**(2): 235-237.

Reddy, G. V. and M. H. Gold (2001). "Purification and characterization of glutathione conjugate reductase: a component of the tetrachlorohydroquinone reductive dehalogenase system from Phanerochaete chrysosporium." Arch Biochem Biophys **391**(2): 271-277.

Regier, N., S. Streb, et al. (2009). "Drought tolerance of two black poplar (Populus nigra L.) clones: contribution of carbohydrates and oxidative stress defence." Plant Cell Environ **32**(12): 1724-1736.

Reichheld, J.-P., M. Khafif, et al. (2007). "Inactivation of Thioredoxin Reductases Reveals a Complex Interplay between Thioredoxin and Glutathione Pathways in Arabidopsis Development." The Plant Cell Online **19**(6): 1851-1865.

Reinemer, P., H. W. Dirr, et al. (1991). "The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 A resolution." EMBO J **10**(8): 1997-2005.

Ren, D., H. Yang, et al. (2002). "Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis." The Journal of biological chemistry **277**(1): 559-565.

Rigo, A., R. Stevanato, et al. (1977). "An attempt to evaluate the rate of the Haber-Weiss reaction by using OH radical scavengers." FEBS Lett **80**(1): 130-132.

Rinaldi, C., A. Kohler, et al. (2007). "Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust Melampsora larici-populina." Plant physiology **144**(1): 347-366.

Robb, E. L., M. M. Page, et al. (2008). "Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD." Biochem Biophys Res Commun **367**(2): 406-412.

Rouhier, N., E. Gelhaye, et al. (2004). "Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems." Cell Mol Life Sci **61**(11): 1266-1277.

Rouhier, N., S. D. Lemaire, et al. (2008). "The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation." Annu Rev Plant Biol **59**: 143-166.

Roxas, V. P., R. K. Smith, Jr., et al. (1997). "Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress." Nature biotechnology **15**(10): 988-991.

Saaranen, M. J., K. E. Salo, et al. (2009). "The C-terminal active site cysteine of Escherichia coli glutaredoxin 1 determines the glutathione specificity of the second step of peptide deglutathionylation." Antioxid Redox Signal **11**(8): 1819-1828.

Salinas, A. E. and M. G. Wong (1999). "Glutathione S-transferases--a review." Curr Med Chem **6**(4): 279-309.

Sampayo-Reyes, A. and R. A. Zakharyan (2006). "Tocopherol esters inhibit human glutathione S-transferase omega." Acta biochimica Polonica **53**(3): 547-552.

Sareen, D., P. R. van Ginkel, et al. (2006). "Mitochondria as the primary target of resveratrol-induced apoptosis in human retinoblastoma cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(9): 3708-3716.

Satheesh, M. A. and L. Pari (2006). "The antioxidant role of pterostilbene in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats." Journal of Pharmacy and Pharmacology **58**(11): 1483-1490.

Scandalios, J. G. (1993). "Oxygen Stress and Superoxide Dismutases." Plant Physiol **101**(1): 7-12.

Schwarz, D. and I. Roots (2003). "In vitro assessment of inhibition by natural polyphenols of metabolic activation of procarcinogens by human CYP1A1." Biochem Biophys Res Commun **303**(3): 902-907.

Sehrawat, A. and R. Deswal (2014). "S-nitrosylation analysis in Brassica juncea apoplast highlights the importance of nitric oxide in cold-stress signaling." J Proteome Res **13**(5): 2599-2619.

Selosse, M.-A. (2011). "L'Evolution par fusion." Pour la Science **400**: 50-56.

Sen Raychaudhuri, S. and X. Deng (2000). "The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants." The Botanical Review **66**(1): 89-98.

Senjo, M., T. Ishibashi, et al. (1985). "Purification and characterization of cytosolic liver protein facilitating heme transport into apocytochrome b5 from mitochondria. Evidence for identifying the heme transfer protein as belonging to a group of glutathione S-transferases." The Journal of biological chemistry **260**(16): 9191-9196.

Shah, N. H. and G. M. Paulsen (2003). "Interaction of drought and high temperature on photosynthesis and grain-filling of wheat." Plant and Soil **257**(1): 219-226.

Shangari, N., T. S. Chan, et al. (2005). "Sulfation and glucuronidation of phenols: implications in coenyzme Q metabolism." Methods in enzymology **400**: 342-359.

Sharma, P. and R. S. Dubey (2007). "Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum." Plant Cell Rep **26**(11): 2027-2038.

Sharma, P. and R. S. Dubey (2007). "Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum." Plant cell reports **26**(11): 2027-2038.

Sheehan, D., G. Meade, et al. (2001). "Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily." The Biochemical journal **360**(Pt 1): 1-16.

Shelton, M. D., P. B. Chock, et al. (2005). "Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation." Antioxid Redox Signal **7**(3-4): 348-366.

Shimabukuro, R. H., D. S. Frear, et al. (1971). "Glutathione conjugation. An enzymatic basis for atrazine resistance in corn." Plant physiology **47**(1): 10-14.

Shoji, T. (2014). "ATP-binding cassette and multidrug and toxic compound extrusion transporters in plants: a common theme among diverse detoxification mechanisms." Int Rev Cell Mol Biol **309**: 303-346.

Simova-Stoilova, L., I. Vaseva, et al. (2010). "Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery." Plant Physiol Biochem **48**(2-3): 200-206.

Singh, S. P., J. A. Coronella, et al. (2001). "Catalytic function of Drosophila melanogaster glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products." Eur J Biochem **268**(10): 2912-2923.

Sinning, I., G. J. Kleywegt, et al. (1993). "Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the Mu and Pi class enzymes." Journal of molecular biology **232**(1): 192-212.

Sjogren, T., J. Nord, et al. (2013). "Crystal structure of microsomal prostaglandin E2 synthase provides insight into diversity in the MAPEG superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(10): 3806-3811.

Sloan, D. B. and N. A. Moran (2012). "Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies." Biology Letters **8**(6): 986-989.

Smirnoff, N. (1995). Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation, BIOS Scientific publishers.

Smirnoff, N. and J. E. Pallanca (1996). "Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress." Biochem Soc Trans **24**(2): 472-478.

Smirnoff, N. and G. L. Wheeler (2000). "Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function." Crit Rev Biochem Mol Biol **35**(4): 291-314.

Smith, A. P., S. D. Nourizadeh, et al. (2003). "Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids." The Plant journal : for cell and molecular biology **36**(4): 433-442.

Sobolev, V. S., B. W. Horn, et al. (2006). "Production of stilbenoids and phenolic acids by the peanut plant at early stages of growth." J Agric Food Chem **54**(10): 3505-3511.

Spedding, G., A. Ratty, et al. (1989). "Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids." Antiviral Res **12**(2): 99-110.

Stein, A. C., S. Alvarez, et al. (2006). "Antifungal activity of some coumarins obtained from species of Pterocaulon (Asteraceae)." J Ethnopharmacol **107**(1): 95-98.

Stone, J. R. and S. Yang (2006). "Hydrogen peroxide: a signaling messenger." Antioxid Redox Signal **8**(3-4): 243-270.

Subirade, I., Y. Fernandez, et al. (1995). "Catechin protection of 3T3 Swiss fibroblasts in culture under oxidative stress." Biol Trace Elem Res **47**(1-3): 313-319.

Summer, K. H., D. Klein, et al. (1996). "2-Chloroacetophenone is an effective glutathione depletor in isolated rat hepatocytes." Archives of toxicology **71**(1-2): 127-129.

Swanson-Mungerson, M., M. Ikeda, et al. (2003). "Identification of latent membrane protein 2A (LMP2A) specific targets for treatment and eradication of Epstein-Barr virus (EBV)-associated diseases." J Antimicrob Chemother **52**(2): 152-154.

Sweetlove, L. J., J. L. Heazlewood, et al. (2002). "The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria." The Plant journal : for cell and molecular biology **32**(6): 891-904.

Syvanen, M., Z. Zhou, et al. (1996). "Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly." J Mol Evol **43**(3): 236-240.

Taguchi, K., M. Shimada, et al. (2008). "Redox cycling of 9,10-phenanthraquinone to cause oxidative stress is terminated through its monoglucuronide conjugation in human pulmonary epithelial A549 cells." Free Radical Biology and Medicine **44**(8): 1645-1655.

Taiz, L. and E. Zeiger (2006). Plant physiology. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.

Takagi, M., T. Kuzuyama, et al. (2000). "A gene cluster for the mevalonate pathway from Streptomyces sp. Strain CL190." J Bacteriol **182**(15): 4153-4157.

Tang, A. H. and C. P. Tu (1994). "Biochemical characterization of Drosophila glutathione S-transferases D1 and D21." The Journal of biological chemistry **269**(45): 27876-27884.

Tang, Z. X. and H. L. Yang (2013). "Functional divergence and catalytic properties of dehydroascorbate reductase family proteins from Populus tomentosa." Mol Biol Rep **40**(8): 5105-5114.

Tanumihardjo, S. A. (2011). "Vitamin A: biomarkers of nutrition for development." Am J Clin Nutr **94**(2): 658S-665S.

Taylor, N. L., D. A. Day, et al. (2004). "Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism." J Exp Bot **55**(394): 1-10.

Taylor, P. W., J. M. Hamilton-Miller, et al. (2005). "Antimicrobial properties of green tea catechins." Food Sci Technol Bull **2**: 71-81.

Telfer, A. (2005). "Too much light? How beta-carotene protects the photosystem II reaction centre." Photochem Photobiol Sci **4**(12): 950-956.

Tennen, R. I., E. Michishita-Kioi, et al. (2012). "Finding a target for resveratrol." Cell **148**(3): 387-389.

Thannickal, V. J. (2009). "Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay." Am J Respir Cell Mol Biol **40**(5): 507-510.

Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-1028.

Thom, R., D. P. Dixon, et al. (2001). "The structure of a zeta class glutathione S-transferase from Arabidopsis thaliana: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism." Journal of molecular biology **308**(5): 949-962.

Thomas, C. E., L. R. McLean, et al. (1992). "Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation." Lipids **27**(7): 543-550.

Tipping, E., B. Ketterer, et al. (1978). "The binding of porphyrins by ligandin." Biochem J **169**(3): 509-516.

Torres, M. A., J. L. Dangl, et al. (2002). "Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 517-522.

Townsend, D. M. (2007). "S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response." Mol Interv **7**(6): 313-324.

Trapp, S. C. and R. B. Croteau (2001). "Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications." Genetics **158**(2): 811-832.

Tuskan, G. A., S. Difazio, et al. (2006). "The genome of black cottonwood, Populus trichocarpa (Torr. & Gray)." Science **313**(5793): 1596-1604.

Tuteja, N., M. B. Singh, et al. (2001). "Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants." Crit Rev Biochem Mol Biol **36**(4): 337-397.

van Acker, S. A., M. N. Tromp, et al. (1995). "Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical." Biochem Biophys Res Commun **214**(3): 755-759.

Verma, A. K. and R. K. Boutwell (1981). "Intracellular calcium and skin tumor promotion: calcium regulation of the induction of epidermal ornithine decarboxylase activity by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate." Biochem Biophys Res Commun **101**(2): 375-383.

Verma, A. K., J. A. Johnson, et al. (1988). "Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin." Cancer Res **48**(20): 5754-5758.

Ververidis, F., E. Trantas, et al. (2007). "Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health." Biotechnol J **2**(10): 1214-1234.

Ververidis, F., E. Trantas, et al. (2007). "Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part II: Reconstruction of multienzyme pathways in plants and microbes." Biotechnol J **2**(10): 1235-1249.

Vogt, T. (2010). "Phenylpropanoid biosynthesis." Mol Plant **3**(1): 2-20.

Vrijsen, R., L. Everaert, et al. (1987). "The poliovirus-induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis." Antiviral Res **7**(1): 35-42.

Wagner, D., D. Przybyla, et al. (2004). "The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of Arabidopsis thaliana." Science **306**(5699): 1183-1185.

Wang, C. L. and H. L. Yang (2011). "Conserved residues in the subunit interface of tau glutathione s-transferase affect catalytic and structural functions." J Integr Plant Biol **53**(1): 35-43.

Wang, C. M., W. Zhou, et al. (2009). "Efficacy of osthol, a potent coumarin compound, in controlling powdery mildew caused by Sphaerotheca fuliginea." J Asian Nat Prod Res **11**(9): 783-791.

Wang, P., J. Liu, et al. (2014). "Ferredoxin:Thioredoxin Reductase Is Required for Proper Chloroplast Development and Is Involved in the Regulation of Plastid Gene Expression in Arabidopsis thaliana." Molecular Plant **7**(10): 1586-1590.

Wang, S. F., T. J. Ridsdill-Smith, et al. (2005). "Chemical defenses of Trifolium glanduliferum against redlegged earth mite Halotydeus destructor." J Agric Food Chem **53**(16): 6240-6245.

Wang, W. and N. Ballatori (1998). "Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions." Pharmacol Rev **50**(3): 335-356.

Waris, G. and H. Ahsan (2006). "Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions." J Carcinog **5**: 14.

Waszczak, C., S. Akter, et al. (2014). "Sulfenome mining in Arabidopsis thaliana." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(31): 11545-11550.

Watanabe, K., K. Kurihara, et al. (1997). "Two types of microsomal prostaglandin E synthase: glutathione-dependent and -independent prostaglandin E synthases." Biochem Biophys Res Commun **235**(1): 148-152.

Wawrzyn, G. T., S. E. Bloch, et al. (2012). "Discovery and characterization of terpenoid biosynthetic pathways of fungi." Methods in enzymology **515**: 83-105.

Weber, U. S., B. Steffen, et al. (1998). "Antitumor-activities of coumarin, 7-hydroxy-coumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines." Res Commun Mol Pathol Pharmacol **99**(2): 193-206.

Weedon, J. T., W. K. Cornwell, et al. (2009). "Global meta-analysis of wood decomposition rates: a role for trait variation among tree species?" Ecol Lett **12**(1): 45-56.

Weerapana, E., C. Wang, et al. (2010). "Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes." Nature **468**(7325): 790-795.

Wei, S. H., A. G. Clark, et al. (2001). "Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly Musca domestica." Insect Biochem Mol Biol **31**(12): 1145-1153.

Weng, J. K., R. N. Philippe, et al. (2012). "The rise of chemodiversity in plants." Science **336**(6089): 1667-1670.

Whang, W. K., H. S. Park, et al. (2005). "Natural compounds,fraxin and chemicals structurally related to fraxin protect cells from oxidative stress." Exp Mol Med **37**(5): 436-446.

Wheeler, G. L., M. A. Jones, et al. (1998). "The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants." Nature **393**(6683): 365-369.

Whitbread, A. K., A. Masoumi, et al. (2005). "Characterization of the omega class of glutathione transferases." Methods in enzymology **401**: 78-99.

Whitehead, T. P., D. Robinson, et al. (1995). "Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum." Clin Chem **41**(1): 32-35.

Wilce, M. C. and M. W. Parker (1994). "Structure and function of glutathione S-transferases." Biochim Biophys Acta **1205**(1): 1-18.

Williams, R. J., J. P. Spencer, et al. (2004). "Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?" Free Radic Biol Med **36**(7): 838-849.

Winter, C. K., H. J. Segall, et al. (1987). "Distribution of trans-4-hydroxy-2-hexenal and tandem mass spectrometric detection of its urinary mercapturic acid in the rat." Drug Metab Dispos **15**(5): 608-612.

Wolf, G. (2001). "The discovery of the visual function of vitamin A." J Nutr **131**(6): 1647-1650.

Wong, J. H., Y. Balmer, et al. (2003). "Unraveling thioredoxin-linked metabolic processes of cereal starchy endosperm using proteomics." FEBS Lett **547**(1-3): 151-156.

Wong, J. H., N. Cai, et al. (2004). "Thioredoxin targets of developing wheat seeds identified by complementary proteomic approaches." Phytochemistry **65**(11): 1629-1640.

Wu, G., Y. Z. Fang, et al. (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." J Nutr **134**(3): 489-492.

Xun, L., S. M. Belchik, et al. (2010). "S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases." Biochem J **428**(3): 419-427.

Yamada, T., J. Komoto, et al. (2005). "Crystal structure and possible catalytic mechanism of microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES-2)." Journal of molecular biology **348**(5): 1163-1176.

Yamamoto, Y. and R. B. Gaynor (2001). "Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer." J Clin Invest **107**(2): 135-142.

Yan, J., N. Tsuichihara, et al. (2007). "Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening." Plant Cell Environ **30**(10): 1320-1325.

Yang, Y., J. Z. Cheng, et al. (2001). "Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation." The Journal of biological chemistry **276**(22): 19220-19230.

Yordanov, I., V. Velikova, et al. (1999). "Influence of Drought, High Temperature, and Carbamide Cytokinin 4-PU-30 on Photosynthetic Activity of Bean Plants. 1. Changes in Chlorophyll Fluorescence Quenching." Photosynthetica **37**(3): 447-457.

Yoshino, K., I. Tomita, et al. (1994). "Effects of long-term dietary supplement of tea polyphenols on lipid peroxide levels in rats." AGE **17**(3): 79-85.

Yuli, I., W. Wilbrandt, et al. (1981). "Glucose transport through cell membranes of modified lipid fluidity." Biochemistry **20**(15): 4250-4256.

Zakharyan, R. A. and H. V. Aposhian (1999). "Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: the rate-limiting enzyme of rabbit liver arsenic biotransformation is MMA(V) reductase." Chemical research in toxicology **12**(12): 1278-1283.

Zakharyan, R. A., A. Sampayo-Reyes, et al. (2001). "Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily." Chemical research in toxicology **14**(8): 1051-1057.

Zhang, X.-S., Z.-W. Li, et al. (2014). "Palladium-catalyzed base-accelerated direct C-H bond alkenylation of phenols to synthesize coumarin derivatives." Organic Chemistry Frontiers **1**(1): 44-49.

Zhang, X., F. C. Dong, et al. (2001). "Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure." Cell Res **11**(1): 37-43.

Zhao, T., S. S. Singhal, et al. (1999). "The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress." Arch Biochem Biophys **367**(2): 216-224.

Résumé : Les glutathion transférases (GSTs) constituent une superfamille ubiquitaire d'enzymes multifonctionnelles impliquées dans les processus de détoxication cellulaire en métabolisant des substrats exogènes appelés xénobiotiques et dans le métabolisme secondaire. Pour cela, ces enzymes peuvent catalyser la conjugaison d'une molécule de glutathion (GSH) sur les composés ciblés ou simplement les lier au travers d'une fonction ligandine. Alors que la fonction de conjugaison est catalysée par les GSTs possédant une sérine ou une tyrosine comme résidu catalytique, certaines d'entre elles possèdent à la place une cystéine. Cette substitution change radicalement leurs propriétés puisque les GSTs à cystéine (Cys-GSTs) catalysent plutôt des réactions de déglutathionylation. Les Cys-GSTs sont retrouvées chez la plupart des organismes et sont réparties en plusieurs classes. Chez les plantes, on trouve principalement 4 classes : déshydroascorbate réductases (DHARs), GSTs Lambda (GSTLs), glutathionyl hydroquinone réductases (GHRs) et mPGES2 (microsomal prostaglandine E-synthase type 2). Alors que le rôle des DHARs semble clairement associé à la réduction du déshydroascorbate en ascorbate, la fonction physiologique des autres Cys-GSTs reste majoritairement inconnue. En combinant des approches moléculaires, cellulaires, biochimiques et structurales, l'analyse fonctionnelle des deux GHRs, des trois GSTLs et des trois DHARs chez l'arbre modèle Populus trichocarpa a été entreprise. De façon intéressante, les gènes GSTL et GHR sont majoritairement exprimés dans les fleurs, les fruits et les pétioles par rapport aux feuilles et aux racines. A l'inverse, les gènes DHAR sont principalement exprimés dans les feuilles. De plus, l'expression transitoire de protéines fusionnées à la GFP dans le tabac a montré que les GSTLs et les DHARs sont localisées dans les plastes, le cytoplasme et le noyau alors que les GHRs sont toutes plastidiales. Les études biochimiques et structurales effectuées à l'aide des protéines recombinantes et de substrats modèles ont montré que la plupart des Cys-GSTs possèdent des activités et des structures assez semblables. Cependant, bien que les GSTLs et les DHARs adoptent un repliement GST canonique classique proche de celui des GSTs Oméga fongiques et humaines, elles sont monomériques alors que les GSTs Oméga sont dimériques. Les GHRs sont particulières tant au niveau de leur interface de dimérisation unique qu'au niveau de leurs propriétés spécifiques de réduction de quinones glutathionylées. En résumé, la nature des substrats fixés par les Cys-GSTs (composés cycliques aromatiques) ainsi que les territoires d'expression de ces gènes et protéines suggèrent que ces protéines sont globalement impliquées dans la protection des plantes face aux contraintes environnementales via la modification, le stockage et/ou le transport de métabolites secondaires et autres composés antioxydants. Toutefois, l'objectif suivant sera de déterminer la nature exacte des substrats/ligands associés à chaque enzyme.

Mots clés : glutathion transférases, cystéine catalytique, Populus trichocarpa, déglutathionylation, structures cristallographiques, détoxication, espèces oxygénées réactives, métabolisme secondaire

Abstract: Glutathione transferases (GSTs) constitute a ubiquitous superfamily of multifunctional enzymes involved in cellular detoxification processes by metabolizing exogenous substrates called xenobiotics and in secondary metabolism. For this purpose, these enzymes catalyze the conjugation of a glutathione molecule (GSH) onto target compounds or simply bind them through a ligandin function. While conjugation reactions are catalyzed by GSTs having a serine or a tyrosine as catalytic residues, other GSTs possess a cysteine. This substitution radically changes their properties since GSTs having a cysteine (Cys-GSTs) rather catalyze deglutathionylation reactions. Cys-GSTs are found in most organisms and are divided into several classes. In plants, there are mainly four classes: dehydroascorbate reductases (DHARs), Lambda GSTs (GSTLs), glutathionyl hydroquinone reductases (GHRs), and microsomal prostaglandin E-synthase type 2 (mPGES). While the role of DHARs seems clearly associated to the reduction of dehydroascorbate into ascorbate, the physiological function of other Cys-GSTs remains largely unknown. By combining molecular, cellular, biochemical and structural approaches, the functional analysis of the two GHRs, the three GSTLs and the three DHARs in the model tree Populus trichocarpa was undertaken. Interestingly, GSTL and GHR genes are predominantly expressed in flowers, fruits and petioles compared to leaves and roots. Conversely, the DHAR genes are mainly expressed in leaves. Furthermore, transient expression of proteins fused to GFP in tobacco showed that GSTLs and DHARs are localized in plastids, cytoplasm and nucleus while GHRs are all localized in plastids. Biochemical and structural studies using recombinant proteins and model substrates showed that most Cys-GSTs have similar activities and structures. However, although GSTLs and DHARs adopt a canonical GST folding similar to that of fungal and human Omega GSTs, they are monomeric whereas Omega GSTs are dimeric. GHRs are particular owing to their unique dimerization interface and to their specific capacity to reduce glutathionylated quinones. In summary, the nature of the substrates bound by Cys-GSTs (heterocyclic aromatic compounds) as well as the expression territories of these genes and proteins, suggest that they are generally involved in the protection of plants towards environmental constraints through the modification, storage and/or transport of secondary metabolites and other antioxidants. However, the next goal will be to determine the exact nature of the substrates/ligands associated with each enzyme.

Key words: glutathione transferases, catalytic cysteine, Populus trichocarpa, deglutathionylation, crystal structures, detoxification, reactive oxygen species, secondary metabolism