# Caractérisation biochimique et structurale de quelques glutathion transférases de la classe Tau d'arabette (Arabidopsis thaliana) et de peuplier (Populus trichocarpa)

Elodie Sylvestre-Gonon

▶ **To cite this version:**

Elodie Sylvestre-Gonon. Caractérisation biochimique et structurale de quelques glutathion transférases de la classe Tau d'arabette (Arabidopsis thaliana) et de peuplier (Populus trichocarpa). Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0253 . tel-03284796

**HAL Id: tel-03284796**
**https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03284796**

Submitted on 22 Feb 2023

**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.

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

**Ecole Doctorale SIReNa (Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles)**

**Thèse**

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE**

Mention « Biologie et écologie des forêts et des agrosystèmes »

par **Elodie SYLVESTRE-GONON**

# Caractérisation biochimique et structurale de quelques glutathion transférases de la classe Tau d'arabette (*Arabidopsis thaliana*) et de peuplier (*Populus trichocarpa*)

Soutenance prévue le 01 décembre 2020

**Membres du jury :**

| | | |
|---|---|---|
| **Rapporteurs :** | Mr Nicolas NAVROT | MCF, Université de Strasbourg |
| | Mr Fabrice NEIERS | MCF, Université de Bourgogne |
| **Examinateurs :** | Mme Catherine CORBIER | Pr, Université de Lorraine |
| | Mme Nathalie GUIVARC'H | Pr, Université de Tours |
| | Mr Nicolas ROUHIER | Pr, Université de Lorraine<br>*Directeur de thèse* |
| | Mr Arnaud HECKER | Pr, Université de Lorraine<br>*Co-directeur de thèse* |
| **Membre invité :** | Mr Claude DIDIERJEAN | MCF, Université de Lorraine |

**UMR INRAe/UL 1136, Interactions Arbres/Micro-organismes, Faculté des Sciences, Boulevard des Aiguillettes, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy**

# Remerciements

# *Remerciements*

Je crois que cette partie est la plus compliquée à rédiger pour moi car je ne suis pas très à l'aise lorsqu'il s'agit de dévoiler mon ressenti ou mes sentiments. Je commencerai donc par le plus simple. Ainsi, je tiens à remercier chacun des membres du jury : Catherine Corbier, Nathalie Guivarc'h, Nicolas Navrot, Fabrice Neiers et Claude Didierjean d'avoir accepté de lire et d'évaluer mes travaux de thèse.

Je souhaite également remercier Christian Dubos et Kévin Robe pour les différents échanges qu'on a pu avoir et qui étaient toujours constructifs de même que Sandrine Mathiot (et de nouveau Claude) sans qui la résolution des structures 3D n'aurait pas été possible. Passons aux choses sérieuses...

Nicolas, je vais commencer par toi car c'est grâce à toi que je suis entrée dans ce labo. Lorsque je t'ai demandé un stage en fin de M1 pour l'année suivante, même si je l'espérais (plus ou moins secrètement), je n'étais absolument pas sûre que cela aboutisse sur une thèse. Tu m'as fait confiance avec Arnaud et pour cela je vous en remercie sincèrement. Certains t'appellent « Papa Nico », je ne me permettrais pas (je suis trop vieille pour être ta fille) ; mais ton dévouement à la science est inspirant voire déstabilisant quelquefois, car si ça me pousse à me dépasser, j'ai aussi peur de (te) décevoir et de ne pas être à la hauteur. C'est peut-être pour ça le « Papa Nico » finalement mais je préfère parler de mentor. Rouhier rime avec convivialité (enfin presque), je crois qu'à part dans ma famille, je n'ai jamais rencontré quelqu'un d'aussi généreux. Bref quel que soit le chemin vers lequel je me dirigerai, je garderai en mémoire la passion que tu as pour ton métier et pour la vie en général.

Arnaud, tu es la première personne que j'ai rencontrée au labo, bien avant Nico. Je te l'ai rappelé il y a quelques années mais en L1 tu as été mon prof référent, si à l'époque on m'avait dit que tu serais mon maître de stage puis mon co-directeur de thèse je n'y aurais pas cru. Je ne sais pas si c'est bien vu de dire qu'on a mutuellement réussi à s'apprivoiser mais en tout cas j'ai été ravie de travailler avec toi (et c'est pas encore fini). Durant ces presque quatre années, tu auras été mon interlocuteur principal, c'est toi qui as essuyé mes premiers tous (interrogations farfelues, doutes, échecs, écrits…) mais aussi mes réussites (y'en a eu quelques-unes). Tu me corrigeras si je me trompe mais dans l'ensemble « notre collaboration » aura plutôt bien fonctionné et donc merci pour tout ça.

Je pense que ce qui suit sera la partie la plus lue de mon manuscrit. J'en ai entendu parler des remerciements hihihi. Il y a de plus en plus de personnes au labo et avec ceux qui ont quitté le labo, ça fait beaucoup de monde à remercier (et un simple merci à tous ne passera pas, dommage). Une fois n'est pas coutume je commencerai par tous ceux que j'aurais pu oublier ou qui ne seraient pas cités, je vous remercie car c'est un peu grâce (ou à cause) de vous que je suis qui je suis maintenant.

Jean-Pierre, notre J2P international, merci pour ta joie de vivre, tes nombreux conseils avisés, les cours d'anglais où on écoutait de la musique, tes leçons d'allemand improvisées (je n'oublierai pas le « umarmung ») bref merci pour tous ces moments passés. J'aurais certainement dû te faire lire les remerciements pour éviter les fautes mais bon ça aurait gâché le suspense (pour la syntaxe c'est normal, j'écris comme je parle ☺).

Eric et Mélanie, une GST côté champi ou plante reste une GST donc merci pour vos conseils, vos remarques, votre bienveillance.

Je tiens à remercier tous les permanents, vous en voyez passer des thésards, ça fait beaucoup de remerciements depuis le temps. Je me contenterai donc de vous dire merci pour tous les bons moments, plus ou moins studieux, plus ou moins festifs passés au labo ou en dehors du labo, je crois qu'il y a pas mal de photos pour en témoigner. Plus sérieusement j'aimerais remercier chacun de vous, Jé, Rod, Tiph, JMG (merci de ne pas m'avoir trop embêtée hihi), Raph, Benji, Ben, Corinne, Marie-Laure, Linda (tu verras tu es tombée dans une équipe super sympa, l'ambiance y est géniale, ça te changera), Alexis et Muriel (vous n'êtes pas permanents mais c'est tout comme), pour ces quasi 4

années à me supporter. Alexis tu m'auras pas mal aidée sur la fin de la thèse, c'était ton boulot mais tu as fait plus que ça tant sur le plan pro que perso (t'es un chic type) MERCI. Les post-docs du labo, Anna et Antonio, qui m'auront fait progresser en anglais (et en espagnol) ou du moins permis de le pratiquer régulièrement, « never forget that French people are not so bad, even if we complain a lot ☺ » ou encore Eléna qui a su me conseiller dès mon arrivée en M2, tu avais raison sur pas mal de truc. Johnny, tu n'es pas resté longtemps quand je suis arrivée au labo mais déjà tu m'avais marquée.
Quand tu es parti j'ai pris ta place (paillasse, bureau, …) et maintenant que tu es revenu je dois partager **MA** paillasse enfin bref je suis contente de la partager avec toi, le p'tit gars de Bousse que le froid de Suède a bien assagi. Juju merci pour toutes tes petites astuces qui m'ont bien aidée (surtout pour la rédac), j'ai une autre vision du Japon et des « geeks » (c'est pas du tout péjoratif attention au contraire) maintenant. Thomas Bacchetta/Bruschetta, tu aurais dû rester en thèse chez IAM on se serait bien marrés mais bon c'est déjà ça tes 6 mois au labo restent encore mémorables, bon courage pour la suite, profite du temps qu'il te reste avant la rédaction.

On passe aux thésards (anciens et nouveaux). Valette, je suis désolée je crois que je n'ai jamais ou très peu réussi à t'appeler Nicolas. On se voit moins depuis que tu es monté au 6, mais toutes les discussions qu'on a eues, les fous rires même les fausses accusations (genre c'est moi qui pète et qui rote) tout ça va me manquer. Vous m'avez accueillie Toto, Flavien et toi dans votre bureau et même si j'étais la seule fille, je me suis toujours sentie à ma place en votre compagnie. Tout ça m'amène à parler de Toto, mon petit Toto, je crois que ma thèse n'aurait pas été la même sans toi, ce n'est pas pour rien qu'on m'appelle « Toto girl » (merci Jé !). Merci vraiment du fond du cœur, que ce soit pour les manips (les fameux tableaux colorés et tout le reste) ou la vie au labo et en dehors. Je ne vais pas m'étendre parce qu'il y aurait trop à dire donc juste à la prochaine Dr Toto. Flavien ou Flavinus Zanninus comme j'aime t'appeler, tu fais partie des murs du labo, je crois que tu es la personne à qui j'ai dû poser le plus de questions concernant le labo et je me souviens qu'à ma 1ère séance de TP au labo (en M2) je suis venue te demander où vous mangiez habituellement le midi (je sais plus pourquoi toi spécifiquement, t'avais une bonne tête). Je crois que je t'ai déjà dit le jour de ta soutenance que je te trouve courageux d'avoir géré ton fils et ta thèse en même temps mais maintenant que je suis passée par la rédaction de la thèse j'ai encore plus de respect pour toi. Courage et m…e pour la suite (force et honneur comme tu dis). Mélanie Lapin ou Jean-Sabine pour les intimes (héhé j'ai pas oublié), t'inquiète je vais pas te faire pleurer. Merci pour ta bonne humeur, ton enthousiasme, ton écoute, tes conseils quand ça n'allait pas de mon côté, tes fous rires. Je te souhaite tout le meilleur du monde pour la suite et t'inquiète si finalement tu concrétises ton projet je serai parmi les premières à tester, tu m'auras encore sur le dos un petit temps. Les petits nouveaux (désolée pour l'expression), Kévin, Loick, Delphine (enfin vous ça fait un petit moment que vous êtes là maintenant), Damien et Marion bon courage pour la suite, vous passerez par toutes les émotions mais ne vous découragez pas et puis après les conseils c'est vous qui les donnerez hein.

A tous les autres, ceux du labo, mes amis et camarades de promo qui ont rendu mon arrivée et ma vie à Nancy plus joyeuses (Victor, Eva, Aurore, Emilie, Audrey, Vincent, Syrine, …), à mes autres amis, à ma famille (vous me connaissez et savez ce que je ressens pour vous) … MERCI POUR TOUT !

Le meilleur pour la fin comme on dit : papa merci pour ce que tu as fait pour moi, je ne l'oublierai pas ; maman, Taylor, Thomas, je vous aime…

**Héhé, finalement ça va je m'en sors pas trop mal pour un exercice dans lequel je suis (normalement) pas très à l'aise !**

*« Tu n'échoues qu'au moment où tu arrêtes d'essayer. »*

***Albert Einstein***

# Table des matières

# *Table des matières*

**Remerciements** ....1

**Table des matières** ....7

**Abréviations** ....13

**Introduction** ....17

Chapitre I : les processus de détoxication chez les plantes ....17

A. La détoxication des espèces oxygénées réactives (EORs) ....17

1. Les systèmes non-enzymatiques ....18

a. Le glutathion ....18

b. Les vitamines C et E : ascorbate et α-tocophérol ....19

c. Les métabolites secondaires impliqués dans la détoxication cellulaire ....20

(1) La famille des terpènes et terpénoïdes ....20

(2) Les composés phénoliques et polyphénols ....22

2. Les systèmes enzymatiques de défense contre les EORs ....23

B. La détoxication des endo- et/ou xénobiotiques ....26

1. La détoxication des xénobiotiques à l'aide du xénome ....26

2. Quelques protéines impliquées dans la détoxication cellulaire ....27

a. Enzymes de phase I ....27

b. Enzymes de phase 2 ....29

c. Protéines de phase III : les transporteurs ....30

Chapitre II : les glutathion transférases ....31

A. Présentation générale de la structure des GSTs canoniques ....32

1. Les GSTs dimériques ....32

2. Certaines GSTs canoniques comportent des spécificités structurales ....33

B. Les GSTs dites non canoniques possèdent des fonctions très spécialisées ....33

1. Les GST Kappa ....34

2. Les protéines MAPEG ....35

3. Les protéines conférant une résistance à la fosfomycine ....36

C. Les GSTs canoniques sont impliquées dans de nombreux processus biologiques ....36

1. Les GSTs sont des enzymes multifonctionnelles ....37

2. Bien que les GSTs soient ubiquitaires, certaines classes ne sont pas présentes chez les plantes ....39

a. Les GSTs à cystéine ....39

(1) GSTs Bêta ....39

(2) GST Oméga ....39

(3) GSTs CLIC ..... 40
b. Les GSTs à sérine ..... 40
(1) GST Delta et Epsilon ..... 40
(2) GSTs Rhô ..... 41
(3) GSTFuA (ou GTE) ..... 41
c. Les GSTs ayant un autre résidu conservé ..... 41
(1) Les GSTs à tyrosine (Alpha, Mu, Pi et Sigma) ..... 41
(2) Les GSTs à arginine ou autre résidu conservé ..... 42
3. Certaines classes sont partagées entre les plantes et divers organismes, d'autres leur sont spécifiques ..... 43
a. GSTs à cysteine catalytique (Cys-GSTs) ..... 43
(1) GSTs Lambda ..... 44
(2) Déshydroascorbate réductases (DHARs) ..... 44
(3) Glutathionyl-hydroquinone réductases (GHRs) ..... 44
(4) GST hémérythrine, iota, métaxine, mPGES-2 ..... 45
b. Les plantes contiennent également des classes atypiques ..... 45
c. Ser-GST de plantes ..... 46
Article 1 : Functional, structural and biochemical features of plant serinyl-glutathione transferases ..... 47
D. Implication des GSTs canoniques dans le métabolisme spécialisé ..... 69
**Problématique de recherche et objectifs de thèse** ..... 73
A. Contexte et objectifs ..... 73
1. Les GSTUs interviendraient dans le métabolisme des coumarines ..... 73
2. Caractérisation des GSTUs de peuplier ..... 74
B. Démarche scientifique ..... 75
**Matériel et méthodes** ..... 79
Chapitre I : Méthodes relatives au clonage des séquences codant les GSTUs ..... 79
A. Construction des vecteurs d'expression ..... 79
B. Les étapes de transformation bactérienne ..... 79
C. Sélection des clones recombinants par PCR sur colonie ..... 80
Chapitre II : Méthodes relatives à l'expression, la production et la purification de protéines recombinantes ..... 80
A. Production des GSTUs d'*Arabidopsis thaliana* et de *Populus trichocarpa* ..... 80
B. Purification des protéines recombinantes ..... 81
1. Purification des protéines étiquetées ..... 81
2. Purification des protéines non étiquetées ..... 81

Chapitre III : Méthodes relatives à la caractérisation biochimique et structurale des protéines recombinantes purifiées ....82

A. Caractérisation biochimique ....82

1. Mesure des activités enzymatiques à l'aide du spectrophotomètre ....82

2. Analyse des interactions par dénaturation thermique par fluorescence ....83

3. Inhibition de l'activité de conjugaison de GSH des GSTUs ....83

B. Caractérisation structurale ....84

**Résultats** ....87

Chapitre I : Caractérisation biochimique de quelques GSTUs d'arabette (*A. thaliana*) et de peuplier (*P. trichocarpa*) ....87

A. Spécification phylogénétique et expression ....87

B. Production et purification des protéines ....92

Article 2 : Is there a role for tau glutathione transferases in tetrapyrrole metabolism and retrograde signalling in plants? ....94

C. Analyse de l'activité catalytique des GSTUs ....121

Chapitre II : La caractérisation structurale des GSTUs ....125

Article 3 : Biochemical and structural insights in two poplar Tau glutathione transferase paralogs GSTU19 and 20 ....128

Chapitre III : La recherche de ligands et substrats des GSTUs ....155

**Discussion et perspectives** ....159

Chapitre I : Les GSTUs présentent des propriétés caractéristiques des GSTs canoniques à sérine conservée ....159

Chapitre II : D'une stabilité à fleur de peau à la résolution de structures tridimensionnelles ....160

Chapitre III : L'identification des ligands et substrats des GSTUs : la recherche du Saint Graal. ....161

Chapitre IV : La place des GSTs de classe tau dans le règne du vivant ....167

A. La classe des GSTs tau est-elle réellement spécifique des plantes ? ....167

B. Une redondance fonctionnelle intra- et interclasses ? ....169

**Références bibliographiques** ....173

**Annexes** ....209

# Abréviations

# *Abréviations*

**ABC :** ATP-binding cassette
**ADN :** Acide désoxyribonucléique
**AMP :** Adénosine monophosphate
**APX :** Ascorbate peroxydase
**Asc :** Ascorbate
**ATP :** Adénosine triphosphate
**BITC :** Benzyl-isothiocyanate
**CAT :** Catalase
**CDNB :** 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène
**CoA** : Coenzyme A
**CuOOH :** Hydroperoxyde de cumène
**CYP450 :** Cytochrome P450
**DEAE :** Diéthylaminoéthyle
**DHAR :** Déhydroascorbate réductase
**γ-ECG :** Gamma glutamylcystéinylglycine
**EOR :** Espèce oxygénée réactive
**GPX :** Glutathion peroxydase
**GR :** Glutathion réductase
**GRX :** Glutarédoxine
**GSH :** Glutathion
**GSNO :** Glutathion nitrosylé
**GSSG :** Disulfure de glutathion
**GSSH :** Glutathion oxydé
**GST :** Glutathion transférase
**HED :** Hydroxyéthyl disulfide
**IMAC :** Immobilized metal affinity chromatography
$k_{cat}/K_m$ **:** Efficacité catalytique
**MAPEG :** Membrane associated proteins in eicosanoids and glutathione metabolism
**MP :** Voie du méthyl-érythritol phosphate
**MVA :** Voie du mevalonate
**NAD(P)H :** Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit
**Ni-NTA :** nickel-acide nitrilotriacétique
**PITC :** Phénéthyl isothiocyanate
**PNP-butyrate :** 4-Nitrophényl butyrate
**PRX :** Peroxyrédoxine
**SDS :** Sodium dodécylsulfate
**SOD :** Superoxyde dismutase
**TRX :** Thiorédoxine

# Introduction

# *Introduction*

Contrairement aux animaux qui ont la faculté de se mouvoir en cas de contraintes, les plantes terrestres ont dû développer d'autres moyens de défense et modes de signalisation cellulaire du fait de leur immobilité. Ainsi, la cellule végétale possède tout un arsenal (enzymatique et non-enzymatique) en charge de préserver l'homéostasie cellulaire, parmi lesquelles se trouvent certaines molécules servant de tampon redox (glutathion, ascorbate, α-tocophérol,…) mais également des protéines. Ces enzymes ont pour la plupart la capacité de neutraliser les composés toxiques, quelquefois à l'aide de molécules non enzymatiques (glutathion ou ascorbate). Dans cette introduction, je présenterai les processus de détoxication présents chez les plantes en exposant d'une part les systèmes non-enzymatiques de détoxication cellulaire et d'autre part les systèmes de détoxication faisant appel à des enzymes. Enfin, je terminerai cette synthèse bibliographique en m'attardant sur les glutathion transférases, des enzymes clés dans la détoxication cellulaire.

## Chapitre I : les processus de détoxication chez les plantes

D'après la définition du dictionnaire Larousse la détoxication est « le processus par lequel l'organisme inactive les substances toxiques d'origine interne ou externe ». Différents mécanismes de détoxication sont présents au sein de la cellule, deux d'entre eux seront abordés dans cette introduction. Le premier concerne l'élimination des espèces oxygénées réactives (EORs) générées entre autres par la photosynthèse et la respiration. La neutralisation de ces EORs fait intervenir des molécules « tampons » et des enzymes plus ou moins spécifiques. Le second concerne la détoxication des xénobiotiques et fait essentiellement intervenir des enzymes.

### A. La détoxication des espèces oxygénées réactives ( EORs)

A faible concentration les EORs interviennent dans de nombreuses voies de signalisations cellulaires en tant que messagers secondaires (del Río *et al.,* 2006; Kärkönen et Kuchitsu 2015; Nazir *et al.,* 2020). Ces molécules sont actives à faible concentration (1-10 nM) (Sies 2017). A forte concentration (>100 nM) (Sies et Jones 2020), ces mêmes molécules peuvent devenir toxiques, créer des cassures de l'ADN, rendre les protéines inactives par oxydation de leurs cystéines et/ou méthionines ou encore affecter la fluidité des membranes cellulaires par « suroxydation » des lipides (Černý *et al.,* 2018). Tout est une question d'équilibre dans la cellule. Ainsi la balance oxydant/antioxydant dépend de mécanismes de défense enzymatiques et non-enzymatiques. Si les systèmes antioxydants ne sont pas assez performants, la cellule sera en condition de stress oxydant.
Il existe différents types d'EORs dont les principaux sont listés dans le tableau 1. Certaines espèces sont radicalaires, c'est-à-dire qu'elles possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés) sur leur couche externe leur procurant une grande instabilité.

**Tableau1 :List edes prin cipalesespèces oxygénées réactives**

*Espèces oxygénées réactives*

| **Radicalaires** | | **Appariées** | |
|---|---|---|---|
| Anion superoxyde | $O_2^{\bullet-}$ | Oxygène singulet | $^1O_2$ |
| Radical peroxyle | $RO_2^{\bullet}$ | Peroxyde d'hydrogène | $H_2O_2$ |
| Hydroperoxyle | $HO_2^{\bullet}$ | Ozone | $O_3$ |
| Radical hydroxyle | $OH^{\bullet}$ | Acide hypochloreux | HOCl |
| Radical alkoxyle | $RO^{\bullet}$ | | |

Cette instabilité vient du fait que ces espèces radicalaires ne respectent pas la règle de l'octet. Ces espèces pourront ainsi réagir avec de nombreux composés de façon non spécifique. Les espèces radicalaires de l'oxygène sont l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical peroxyle ($RO_2^{\bullet}$) ou hydroperoxyle ($HO_2^{\bullet}$), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) et le radical alkoxyle ($RO^{\bullet}$) (Gardès-Albert *et al.,* 2003; Migdal et Serres 2011). D'autres encore seront plus stables car correctement appariées comme l'oxygène singulet ($^1O_2$), le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$), l'ozone ($O_3$) et l'acide hypochloreux (HOCl). La régulation des concentrations en EORs est si importante pour la cellule que cette dernière a mis en place différents mécanismes pour la contrôler.

## 1. Les systèmes non-enzymatiques

De nombreuses molécules sont dites antioxydantes bien que dans certains cas, ce terme a plus un intérêt mercantile qu'une réelle action antioxydante. Les molécules reconnues comme ayant une activité antioxydante directe et avérée et dont je parlerai dans le paragraphe suivant sont le glutathion (GSH), les vitamines A et E et quelques métabolites secondaires (flavonoïdes et caroténoïdes).

### *a. Le glutathion*

Le tripeptide γ-glutamyl-cystéinyl-glycine (γ-ECG) ou glutathion est le co-facteur de nombreuses enzymes antioxydantes comme les glutarédoxines (GRXs), glutathion transférases (GSTs) ou certaines glutathion peroxydases (GPXs). Au sein de la cellule le glutathion est présent sous forme réduite (GSH, représente une très grande majorité du glutathion cellulaire) ou oxydée (GSSG, GSNO, GSOH, $GSS_nH$, …). Le GSH a été mentionné dès 1888 par de Rey-Pailhade comme une substance réagissant spontanément avec du soufre (Meister 1988). Depuis, ses propriétés antioxydantes n'ont cessé d'être étudiées. Le GSH est retrouvé chez la majorité des organismes mais certaines bactéries en sont dépourvues et utilisent à la place du mycothiol ou du bacillithiol (Newton *et al.,* 2008; Si *et al.,* 2019). Outre le cytosol, le GSH réduit est également retrouvé dans le réticulum endoplasmique, la vacuole, la mitochondrie, le chloroplaste, le peroxysome et l'apoplaste (Noctor et Foyer 1998; Foyer et Noctor 2011). Chez les plantes, la synthèse du GSH est effectuée dans le chloroplaste pour la première et dans le chloroplaste et le cytosol pour la seconde étape (Hasanuzzaman *et al.,* 2017). La synthèse de glutathion se déroule en deux étapes ATP-dépendantes catalysées respectivement par la γ-glutamylcystéine synthétase et la glutathion synthétase. Du fait de cette synthèse limitée à certains compartiments, des systèmes d'import/export de GSH permettent un transport d'un compartiment à un autre (Mahmood *et al.,* 2010; Calabrese *et al.,* 2017). Le groupement thiolate de la cystéine du GSH est le groupement réactif. Le GSH, du fait de son fort pouvoir réducteur, s'oxyde après avoir réagi. La régénération du GSH est catalysée par les glutathion réductases (GR) des flavoprotéines NADPH-dépendantes. Outre la régénération du GSH, une part non négligeable de GSH est synthétisée de novo pour maintenir une concentration intracellulaire de GSH oscillant entre 0.1 et 15 mM (Deponte 2013) et un rapport GSH/GSSG cellulaire favorable (Lu 2001). L'activité réductrice intrinsèque du GSH n'est pas négligeable par rapport à celle de certains enzymes, dont la fonction est souvent d'accélérer les réactions biochimiques spontanées. En effet l'activité de réduction non enzymatique de l'anion superoxyde par une molécule de GSH est de l'ordre de $10^5$ $M^{-1}.s^{-1}$ alors que la réaction de dismutation de l'anion superoxyde réalisée par la SOD est de l'ordre de $10^9$ $M^{-1}.s^{-1}$ (Deponte 2017). La SOD est proche de la « perfection catalytique » sachant que l'efficacité catalytique d'une enzyme est limitée par la diffusion/mouvement brownien (de l'ordre de $10^9$-$10^{10}$ $M^{-1}.s^{-1}$) (Alberty et Hammes 1958; Eigen et Hammes 1963; Koenig et Brown 1972).

Le glutathion intervient dans de nombreuses fonctions biologiques. Au sein de la mitochondrie, le GSH contribue notamment au repliement des protéines, à la biosynthèse des centres fer-soufre, à la protection des protéines en empêchant une suroxydation de celles-ci, à la détoxication des peroxydes et à la régulation redox (Calabrese *et al.,* 2017). Plus largement le GSH possède un rôle central dans

l'homéostasie cellulaire en intervenant notamment dans le métabolisme des stéroïdes, des eicosanoïdes et autres lipides, ou encore dans la détoxication des endo/xénobiotiques (Deponte 2017).

### b. *Les vitamines C et E : ascorbate et α-tocophérol*

De nombreuses enzymes utilisent l'ascorbate (Asc) comme co-substrat, à l'instar des déshydroascorbate réductases (DHARs, appartenant à la famille des GSTs), des ascorbate peroxydases (APXs) ou encore des dioxygénases, de l'époxydase ou de la myrosinase pour ne citer que quelques exemples. Cette molécule de faible masse moléculaire est elle aussi une molécule antioxydante à proprement parler. Elle est d'ailleurs la molécule antioxydante la plus répandue chez les plantes et les cyanobactéries (Radyukina *et al.*, 2019). Synthétisée dans le cytosol et la mitochondrie (dernière étape) pour certains ou exclusivement dans la mitochondrie pour d'autres, l'ascorbate est retrouvé dans tous les organites et l'apoplaste. Du fait de sa petite taille, son transport serait réalisé par diffusion à travers les membranes ou selon le gradient électrochimique mais il pourrait également être transporté par des canaux ou des transporteurs. 30 à 40% de la réserve cellulaire d'ascorbate se trouvent dans le chloroplaste où sa concentration peut atteindre 20 à 50 mM (Mahmood *et al.*, 2010; Smirnoff 2018; Radyukina *et al.*, 2019; Sharova *et al.*, 2020). Egalement connu sous le nom de vitamine C, l'Asc est synthétisé par les plantes et les animaux mais pas par les primates qui doivent l'incorporer par le biais de leur alimentation du fait de la perte de fonction de la L-gulonolactone oxydase, l'enzyme catalysant la dernière étape de sa voie de biosynthèse (Nishikimi et Yagi 1991). De par sa réactivité avec les superoxydes (>$10^5$ $M^{-1}.s^{-1}$), l'ascorbate peut compléter l'action des SOD du fait de sa forte concentration (Smirnoff 2018). La réserve d'ascorbate est régénérée lors d'un stress oxydant notamment au travers du cycle ascorbate-glutathion. L'ascorbate intervient dans la détoxication des EORs en étant le substrat des ascorbate peroxydases, enzymes réduisant l'$H_2O_2$ en $H_2O$ dans la voie Foyer-Halliwell-Asada (cycle ascorbate-glutathion) (Figure 1). L'ascorbate intervient aussi dans la régulation de la croissance des plantes, dans l'assimilation du fer par réduction du $Fe^{3+}$ en $Fe^{2+}$ notamment, ou encore dans la signalisation et la défense contre le stress (Sharova *et al.*, 2020).

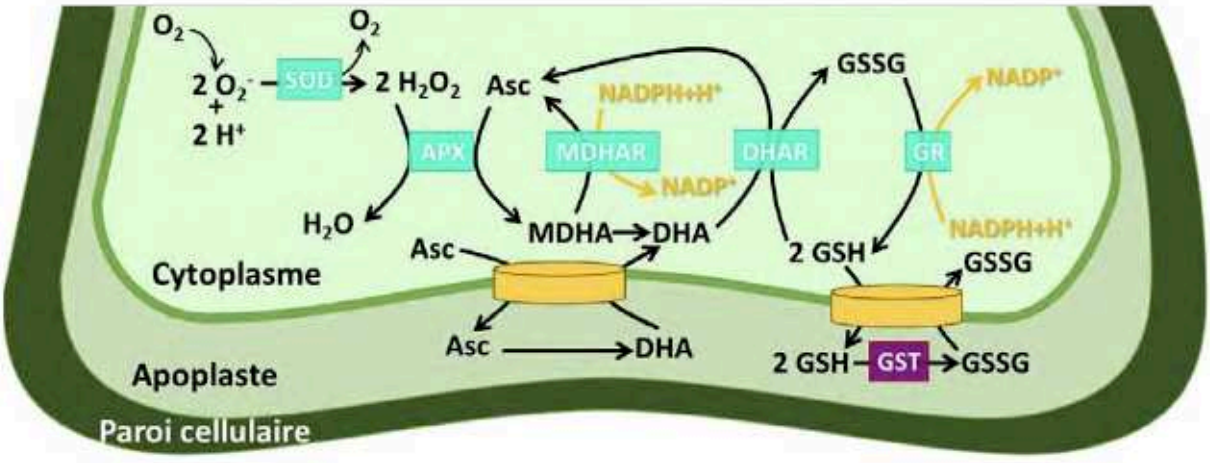



**Figure 1 : La voie Foyer-Halliwell-Asada (Adaptée de Noctor et Foyer 1998; Vanacker *et al.*, 1998).** Le recyclage de l'ascorbate est réalisé au travers du cycle ascorbate-glutathion encore appelé voie de Foyer-Halliwell-Asada et se déroule dans le cytosol mais également dans la mitochondrie, le chloroplaste ou le peroxysome. Ce cycle intervient dans la détoxication d'$H_2O_2$. $H_2O_2$ est réduit en eau par l'ascorbate peroxydase (APX) qui utilise l'ascorbate (Asc) comme donneur d'électron. Cette étape aboutit à la formation de monodéshydroascorbate (MDHA) qui après dismutation se transforme en déshydroascorbate (DHA). L'ascorbate est régénéré soit à partir de MDHA par une MDHA réductase (MDHAR) NADPH-dépendante soit à partir de DHA par une DHA réductase (DHAR) glutathion-dépendante. La régénération du GSH est effectuée par la glutathion réductase (GR) dépendante du pouvoir réducteur du NADPH.

La vitamine E ou encore α-tocophérol est une autre vitamine engagée dans la détoxication des EORs.

Cette molécule est retrouvée chez tous les organismes photosynthétiques, les animaux et certains champignons. Il existe d'autres formes de vitamines E (tocophérols et tocotriénols) mais la forme alpha est la plus active biologiquement. La vitamine E a un rôle clé dans la défense contre la peroxydation des membranes lipidiques. Cette molécule liposoluble réduit les radicaux lipidiques (Triantaphylidès et Havaux 2009). Elle est composée d'un noyau chromane associé à une chaîne aliphatique saturée (tocophérol) ou insaturée (tocotriénol). De par la fonction hydroxyle de son noyau chromane, la vitamine E est responsable de la neutralisation des EORs (Kruk *et al.,* 2005).

### *c. Les métabolites secondaires impliqués dans la détoxication cellulaire*

Les métabolites secondaires de plantes sont des composés spécialisés et spécifiques, impliqués dans la défense et la signalisation et sont essentiels à la survie et aux capacités reproductives des plantes (Wink 2003; Firn et Jones 2009). De nos jours, il serait plus correct d'employer le terme de métabolites spécialisés pour qualifier les métabolites secondaires (et métabolites généraux pour les métabolites primaires). Cette notion de composé spécialisé élimine ainsi l'idée que les métabolites secondaires ont une moindre importance que les métabolites qualifiés de primaires (Firn et Jones 2009). Parmi la multitude de métabolites spécialisés synthétisés par les plantes, la classe des terpènes (et terpénoïdes) et celle des composés phénoliques regroupent la majorité des métabolites spécialisés impliqués dans les processus de détoxication cellulaire.

#### (1) LA FAMILLE DES TERPENES ET TERPENOÏDES

Les terpènes (hydrocarbures simples) et terpénoïdes (hydrocarbures substitués de groupements fonctionnels) appartiennent à la même famille de dérivés d'unités isoprènes ($C_5H_8$). Les terpènes sont majoritairement produits par les conifères et retrouvés dans la résine, notamment dans la térébenthine qui lui confère son nom (térébenthine se dit « terpentin » en allemand). Les terpénoïdes également nommés isoprénoïdes se situent à la frontière entre métabolites généraux et spécialisés. Ces molécules sont des pigments photosynthétiques, des molécules transportant des électrons et régulant la croissance et le développement des plantes (Tholl 2015). Considérés comme possédant une haute valeur ajoutée, les terpénoïdes sont appréciés en tant que parfums, arômes, biocarburants, compléments alimentaires, insecticides et produits pharmaceutiques (Tippmann *et al.,* 2013; Zerbe et Bohlmann 2015). Souvent regroupés sous le terme générique « terpènes », les terpènes et terpénoïdes sont synthétisés à partir de deux voies métaboliques, la voie du mévalonate (MVA) et celle du méthyl-érythritol phosphate (MEP), aboutissant chacune à la formation de l'isopentényl diphosphate (IPP) (Figure 2). La voie MVA est utilisée par les animaux et les champignons alors que celle MEP est utilisée par les bactéries. Les plantes quant à elles, sont capables d'utiliser ces deux voies, la voie MVA se déroule à cheval entre le cytosol et le peroxysome alors que la voie MEP se déroule exclusivement dans le chloroplaste (Paramasivan et Mutturi 2017; Henry *et al.,* 2018; Jan et Abbas 2018).

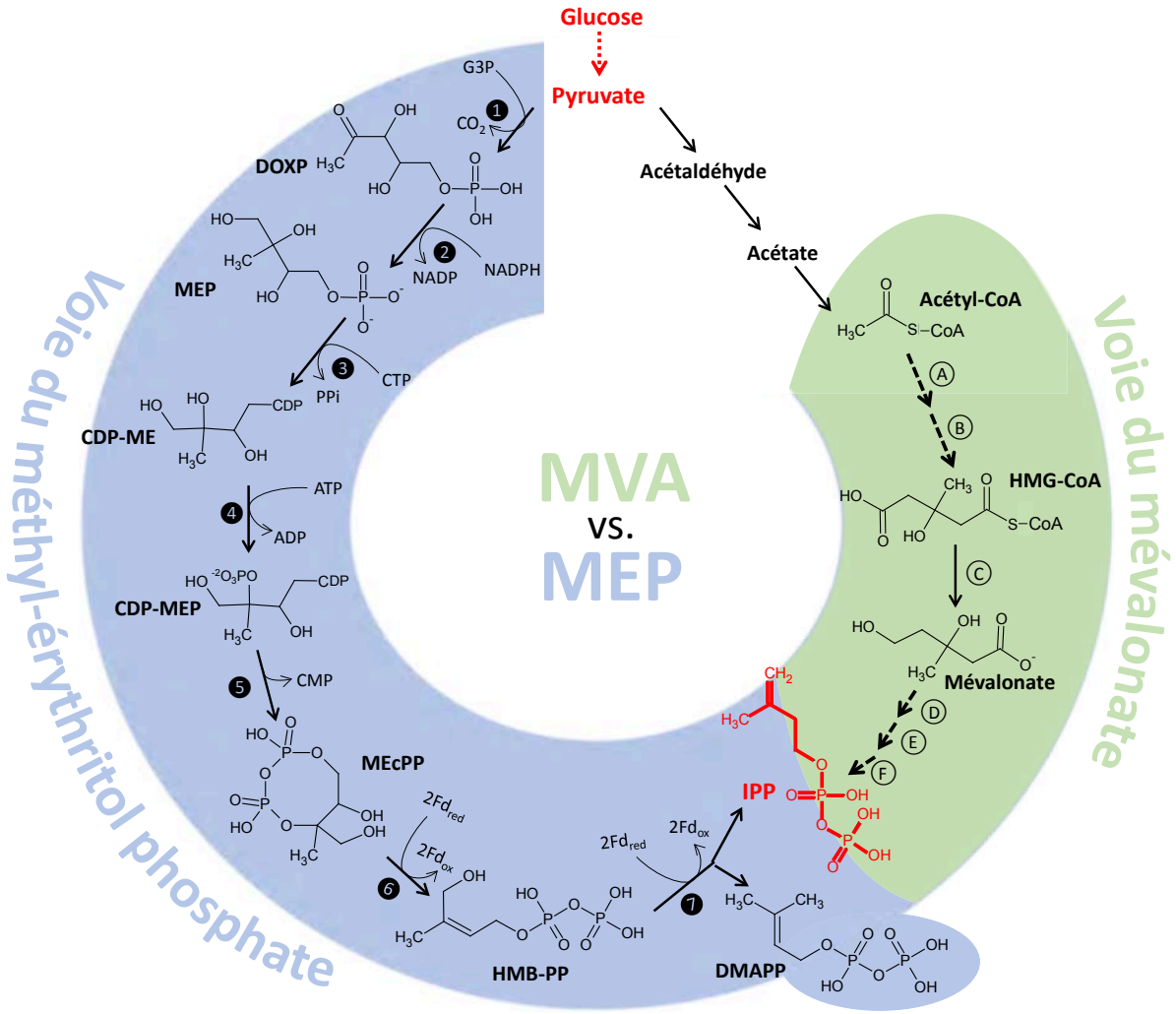



**Figure 2 : Biosynthèse de l'isopentényl pyrophosphate : le précurseur des terpènes (Adaptée de Paramasivan et Mutturi 2017).**

Les voies du mévalonate (MVA) et du méthyl-érythritol phosphate (MEP) conduisent à la formation de l'isopentényl pyrophosphate (IPP). Dans un souci de simplification du graphique, seules les étapes clés de la voie MVA sont présentées ici. La voie MVA, également appelée voie du 3-hydroxy-3-méthylglutamyl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase (enzyme catalysant la formation du MVA), fait intervenir 5 enzymes. Ainsi l'acétyl-CoA C-acétyltransférase (thiolase II, A) et l'hydroxyméthylglutaryl-CoA synthétase (HMG-CoA synthétase, B) catalysent la formation de HMG-CoA. La HMG-CoA réductase (C) réduit le HMG-CoA en mévalonate puis les mévalonate kinase (D), phosphomévalonate kinase (E) et diphosphomévalonate décarboxylase (F) induisent la formation d'IPP. La voie MEP est quant à elle également appelée voie du 2-C-méthylérythritol-4-phosphate (MEP)/1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP) ou encore « voie non mévalonique ». La DOXP synthétase (DXS, ❶) transforme le pyruvate en DOXP alors que la DOXP réductase (DXR ou IspC, ❷) réduit ce dernier en MEP. Les réactions catalysées par les MEP cytidylyltransférase (IspD, ❸), 4-diphophocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol (CDP-ME) kinase (IspE, ❹) et 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate (CDP-MEP) synthétase (IspF, ❺) aboutissent à la formation de 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclopyrophosphate (MEcPP). Pour finir les (E)-4-hydroxy-3-méthyl-but-2-ényl-pyrophosphate (HMB-PP) synthétase (IspG, ❻) et réductase (IspH, ❼) conduisent à la production des IPP et diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP).

L'isopentényl pyrophosphate isomérase converti l'IPP en diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP). Des réactions de condensation entre le DMAPP et des unités IPP seront à l'origine d'une grande variété de terpènes, qui seront tous des multiples de l'unité IPP à 5 carbones (Nagel *et al.,* 2019). A titre d'exemple, les caroténoïdes constituent une classe de terpénoïdes lipophiles, jouant un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions aussi bien chez les plantes que chez les autres organismes chez qui on les retrouve (algues, champignons, bactéries, archées). Chez les plantes, les caroténoïdes sont essentiels à la photosynthèse, interviennent dans le développement et sont présents dans tous les types de plastes (étioplastes, amyloplastes, chloroplastes et chromoplastes) à des concentrations différentes (Li *et al.,* 2016; Sun *et al.,* 2018). Au sein du chloroplaste, les caroténoïdes captent l'énergie lumineuse par leur chaine carbonée insaturée essentiellement et interviennent dans la photoprotection en dissipant l'excès d'énergie des photosystèmes de la chlorophylle (Demmig-Adams 1990; Havaux 2014). Les chromoplastes sont le lieu de stockage et de synthèse massifs de caroténoïdes. La couleur des fruits et légumes orangés-rouges (tomates, poivrons, …) est due à cette accumulation de caroténoïdes dans les chromoplastes dans lesquels ils auront une forte photostabilité *in situ* (Sun *et al.,* 2018). Les caroténoïdes sont également capables de neutraliser les EORs du fait de leur structure linéaire poly-carbonée et insaturée.

### (2) LES COMPOSES PHENOLIQUES ET POLYPHENOLS

Les composés phénoliques contiennent au moins un noyau benzène substitué par une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ces composés sont souvent nommés polyphénols par abus de langage même s'ils ne présentent qu'un seul cycle phénolique. Présents chez les plantes et les champignons, ces composés comprennent les lignines, les tanins, les benzophénones, les stilbénoïdes, les flavonoïdes (et dérivés) et les coumarines (et leurs dérivés). Les benzophénones sont des composés phénoliques particuliers, composés de deux noyaux phénols A et B reliés par une liaison carbonyle. Seul le cycle A est issu de la voie du shikimate (voir ci-dessous), le cycle B provenant de la voie MVA. Comme pour les autres composés phénoliques ce sont les groupements hydroxyles des cycles benzéniques qui confèrent à ces molécules des propriétés antioxydantes, en piégeant puis neutralisant les EORs. Les stilbénoïdes sont constitués de deux noyaux phénol liés par deux atomes de carbone. Le resvératrol, le stilbénoïde le plus étudié, est impliqué dans le mécanisme antioxydant de la cellule (Lorenz *et al.,* 2003). Les flavonoïdes, les coumarines et leurs dérivés sont très représentés chez les plantes.

#### Les flavonoïdes et dérivés

Le terme flavonoïde provient du latin *flavus* (jaune) en référence à la couleur des agrumes dans lesquels les premiers flavonoïdes ont été identifiés. Les flavonoïdes sont tous constitués du noyau flavane (figure 3) contenant deux cycles phényles (A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné à trois atomes de carbones (C) ($C_6$-$C_3$-$C_6$) (Cazarolli *et al.,* 2008).

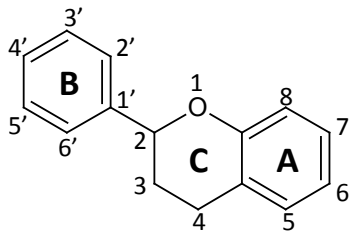



**Figure: 3 Le noyau flavane.**
Le noyau flavane est la structure de base des flavonoïdes.

Onze sous-types de flavonoïdes ont été répertoriés en fonction de critères structuraux (Ververidis *et al.,* 2007; Cazarolli *et al.,* 2008; Uivarosi et Munteanu 2017) prenant notamment en compte la présence de fonctions hydroxyles et/ou cétones sur le cycle C, le degré de saturation de ce cycle ou encore la

position du cycle B (C2, C3 ou C4). Les flavonoïdes sont des pigments conférant aux fleurs et aux fruits, entre autres, leur couleur rouge-violacée (fraise, pivoine, mûre, etc) ou jaune-orangée (orange, citron, etc) pour d'autres (Pan *et al.,* 2010). Les flavonoïdes sont ainsi impliqués dans le pouvoir attracteur des plantes. Chez l'homme, les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoire, antioxydante, anti-carcinogène et antivirale pour ne citer que celles-ci (Pan *et al.,* 2010; Uivarosi et Munteanu 2017). Les flavonoïdes ont la capacité de chélater les métaux, cette propriété a été envisagée comme traitement anticancéreux (Uivarosi et Munteanu 2017). Ainsi de par les multiples propriétés qu'ils détiennent, les flavonoïdes ont un rôle primordial au sein de la cellule. Un autre critère pour classer les flavonoïdes est la capacité du cycle C à se présenter sous la forme d'un ion flavylium. L'ion flavylium (2-phenylbenzopyrylium) est l'ion oxonium caractéristique des anthocyanes. Les anthocyanes sont des pigments de couleurs bleu-violacée (en passant par le rouge ou le noir en fonction du pH). Leur nom vient d'ailleurs du grec *anthos* (fleur) et *kyanos* (bleu) (Andersen 2001). La couleur bleue de certaines fleurs est due aux atomes de magnésium liés par les anthocyanes. Les anthocyanes sont présents essentiellement au niveau des fleurs, mais le sont également dans les racines, les fruits, les bulbes, les tiges et les feuilles (Andersen 2001; Andersen et Jordheim 2010; Shi et Xie 2014).

### Les coumarines et leurs dérivés

Les coumarines diffèrent des flavonoïdes notamment par la position de la cétone du cycle C de ces derniers. En effet la cétone des coumarines se trouve en C2 alors que celle des flavonoïdes est positionnée en C4. On parle alors de noyau coumarine pour les coumarines et de noyau chromone (1,4-benzopyrane) pour les flavonoïdes. Les coumarines ont été isolées pour la première fois en 1820 par Vogel et Guibourt dans la fève tonka. Ces molécules ont été largement étudiées dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique pour leur valeur ajoutée dans les parfums ou arômes mais présentent également différentes propriétés pharmacologiques (antibactériennes, antifongiques ou encore antivirales) chez les mammifères (Ngameni *et al.,* 2009; Selim et Ouf 2012; Poumale *et al.,* 2013; Liang *et al.,* 2017). Trois types de coumarines sont retrouvés : les coumarines, les furocoumarines et les pyrocoumarines. Les coumarines (forme basique) sont constituées du noyau coumarine, les furocoumarines et pyrocoumarines possèdent en supplément un cycle furane ou pyrane. Chez les plantes non graminées les coumarines sont sécrétées par les racines par l'intermédiaire d'un transporteur membranaire de type ABC appelé PDR9 (ABCG37), afin de faciliter la solubilisation du fer ferrique présent dans le sol (Römheld et Marschner 1983; Fourcroy *et al.,* 2014). Les coumarines, comme d'autres composés phénoliques existent sous forme glycone ou aglycone. La dénomination –ine étant la plupart du temps réservée aux formes glycones et celle –étine aux formes aglycones. Ainsi l'esculine se trouve être la forme glycosylée de l'esculétine. Dans le cadre de la solubilisation du fer, ce sont les formes aglycones qui sont sécrétées dans la rhizosphère, les formes glycones étant intracellulaires.

Lorsqu'ils sont présents en forte concentration, les métabolites spécialisés peuvent engendrer des effets néfastes pour la cellule. Cette dernière utilise un mécanisme en trois étapes pour neutraliser ces composés devenus toxiques (voir ce chapitre paragraphe B.1).

## 2. Les systèmes enzymatiques de défense contre les EORs

Les effets néfastes des EORs peuvent être contournés de diverses façons. Dans certains cas, des enzymes vont agir en amont de la production des EORs ou réparer les méfaits de ces derniers. L'enzyme alternative oxydase (AOX) accepte les électrons de la chaine de transports des électrons mitochondriale diminuant ainsi leur fuite, une source non négligeable conduisant à la production d'EORs. Les méthionine sulfoxyde réductases réduisent les méthionines oxydées par les EORs (méthionine sulfoxyde) en méthionine (Boschi-Muller *et al.,* 2005; Rouhier *et al.,* 2006).

Dans d'autres cas, les enzymes prendront directement en charge les EORs. Ces enzymes, plus ou moins spécifiques des EORs, comprennent les SODs, les catalases (CATs), les APXs et des enzymes à repliement thiorédoxine.

Les SODs sont des métalloenzymes qui catalysent la neutralisation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en dioxygène. Présentes chez tous les organismes aérobies, ces enzymes sont regroupés en 4 classes dont seulement 3 sont retrouvées chez les plantes. Il s'agit des SOD à cuivre ou zinc (Cu/Zn-SOD), à fer (Fe-SOD) à manganèse (Mn-SOD) et enfin à nickel qui n'est retrouvée que chez les procaryotes. Les Cu/Zn-SOD sont principalement exprimées dans le cytosol et les chloroplastes, les Fe-SOD dans les chloroplastes et les Mn-SOD dans les mitochondries (Gill *et al.,* 215; Khedia *et al.,* 219). Ces localisations subcellulaires ne sont pas étonnantes du fait de la forte production d'EORs dans les mitochondries et les chloroplastes (chaines de transport des électrons). Dans les Cu/Zn-SOD, l'atome de cuivre semble plus important que celui de zinc car sa substitution par un autre métal (ou son exclusion) entraîne l'inactivation de l'enzyme. L'atome de zinc aurait un rôle purement structural puisque sa substitution par un autre cation divalent (ou son élimination) n'a pas d'effet significatif sur l'activité de l'enzyme (Gill *et al.,* 215). D'un point de vue structural (structures primaire, secondaire et tertiaire), les Fe-SOD et les Mn-SOD ont un haut degré de similarité suggérant ainsi qu'elles proviendraient du même ancêtre commun et qu'elles seraient plus anciennes que les Cu/Zn-SOD (Gill *et al.,* 215). Outre son activité dans la maintenance de l'état redox du cytosol, il a été montré qu'une SOD cytosolique d'orge serait impliquée dans la régulation de la réponse à certains pathogènes. En effet, le gène codant cette protéine est surexprimé lors d'une infection par le pathogène hémibiotrophe *Pyrenophora teres f. teres* alors qu'aucun effet n'est observé lors de l'infection par d'autres pathogènes hémibiotrophes tels que *Magnaporthe oryzae* et biotrophe *Blumeria graminis f. sp. Hordei* (Lightfoot *et al.,* 217).

Les CATs catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau. Les catalases sont retrouvées chez la plupart des organismes vivants. Ces enzymes peroxysomales sont souvent utilisés comme marqueur redox de ce compartiment cellulaire (Smirnoff et Arnaud 219). Les CATs sont très présentes dans les peroxysomes, probablement du fait que ces enzymes ont une forte affinité pour le peroxyde d'hydrogène. Leur forte concentration dans les peroxysomes permet aux catalases de métaboliser un large flux d'$H_2O_2$ sans que ceci n'ait d'incidence sur l'état redox global de la cellule (Smirnoff et Arnaud 219). Les catalases peuvent être classées en 3 groupes en fonction de caractères structuraux (homologie de séquence) et biochimiques (propriétés cinétiques enzymatiques). Le premier groupe correspond à celui des catalases typiques (hème-catalases monofonctionnelles), des enzymes tétramériques présentes chez la plupart des organismes aérobies et liant 4 molécules d'hème. Le second groupe comprend les catalases-peroxydases qui lient les hèmes et peuvent exister sous forme dimérique ou tétramérique. Ces catalases bifonctionnelles (activité peroxydase et catalase) sont retrouvées dans tous les règnes du vivant, bien que, chez les eucaryotes ces dernières n'aient été détectées que chez les champignons (Zmock et Koller 1999). Les catalases à hème utilisent les changements d'état redox du fer hémique pour réduire $H_2O_2$. Le dernier groupe de catalase correspond à celui des manganèse (Mn) catalases. Les Mn-catalases voient leur groupement prosthétique hémique remplacé par un ion manganèse. Contrairement aux autres types de catalase dont l'activité peut être inhibée par le cyanure, l'activité catalase de la Mn-catalase est inhibée par des azotures (Zmock et Koller 1999; Whittaker 212). Certains microorganismes pathogènes produisant du cyanure d'hydrogène lors de l'invasion de l'hôte, il a été suggéré que la résistance au cyanure de la Mn-catalase permettrait à cette dernière de jouer un rôle lors de ladite infection fongique (Whittaker 212). Bien que les catalases soient décrites comme exprimées exclusivement dans les peroxysomes, certaines catalases d'*Oryza sativa* sont exprimées exclusivement dans la membrane plasmique ou d'autres ont une double localisation subcellulaire peroxysomale et cytosolique (Alam et Ghosh 218).

Une CAT cytosolique d'*Oryza sativa* (OsCATD) présente une organisation structurale particulière. Alors que les catalases de plantes contiennent en général 500 acides aminés, cette CAT atypique en possède environ 2400 et présente un domaine supplémentaire responsable de la fixation d'AMP. Cependant le rôle de cet extra-domaine n'est pas clair. Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que les catalases, au nombre de trois, seraient impliquées dans la régulation de la croissance. En effet, le triple mutant présente des défauts de croissance associés à de graves troubles d'oxydoréduction (Su *et al.*, 2018).

Les APXs sont restreintes aux organismes photosynthétiques bien qu'absentes chez les cyanobactéries (Smirnoff et Arnaud 2019). Les APXs sont des peroxydases à hème ayant une forte affinité pour $H_2O_2$. Une carence en fer divise par 2 l'activité des APXs. Elles utilisent l'ascorbate comme donneur d'électron pour réduire l'$H_2O_2$ en eau. Les APX sont exprimées dans le chloroplaste, la mitochondrie, le peroxysome, le cytosol et probablement dans le noyau (Anjum *et al.*, 2016; Smirnoff et Arnaud 2019). Du fait de l'absence de catalases dans les chloroplastes, les APXs ont un rôle crucial dans ce compartiment cellulaire. La surexpression des APXs augmente la résistance aux stress à l'instar des APXs d'*Arabidopsis thaliana* qui jouent un rôle dans la tolérance au stress salin chez cet organisme (Saxena *et al.*, 2020). Un schéma récapitulatif des différents acteurs intervenant dans le processus de détoxication est présenté en figure 4.

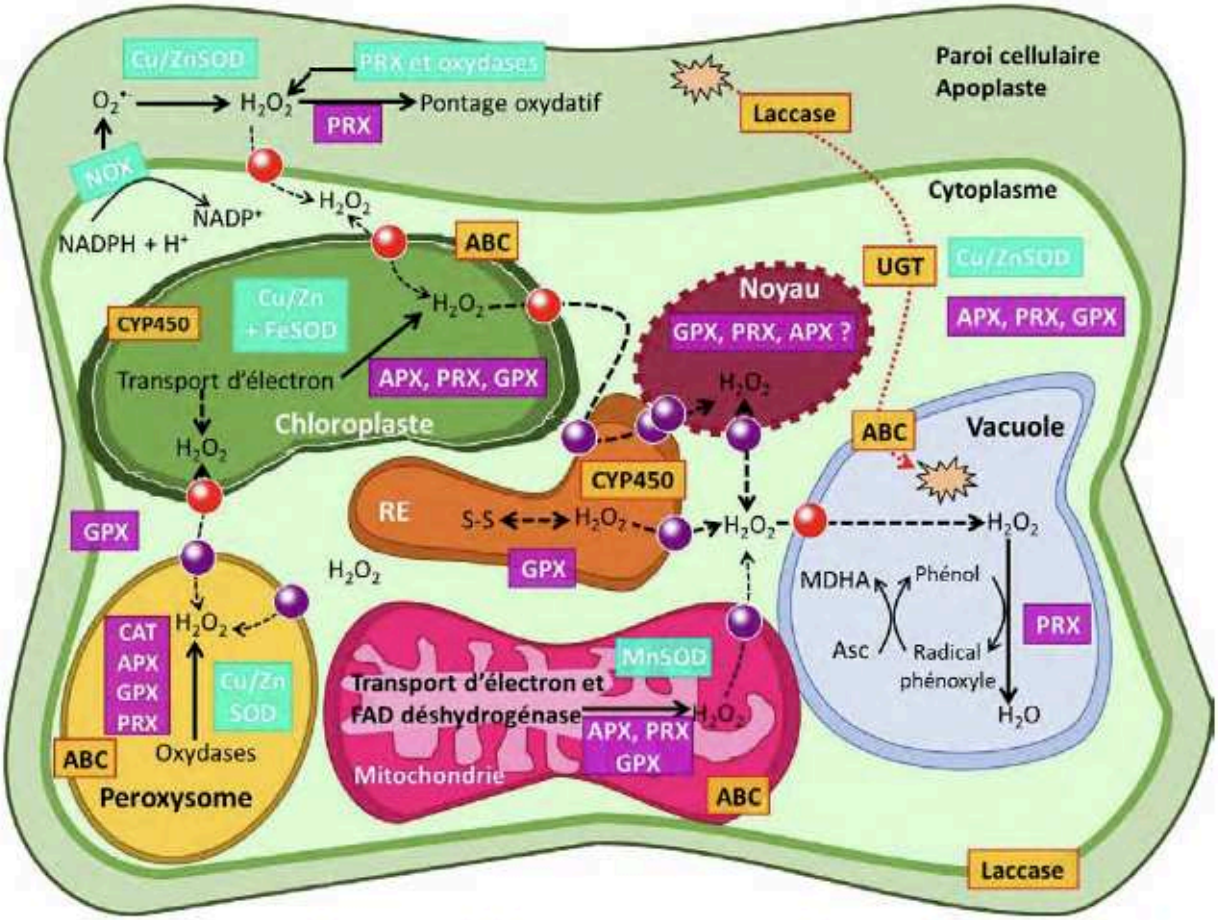



**Figure 4 : Les systèmes de détoxication chez les plantes (Adaptée de Smirnoff et Arnaud 2019).** Schéma récapitulatif des principaux acteurs du système de détoxication des endo/xénobiotiques et d'$H_2O_2$ chez les plantes. Le xénobiotique (symbole de couleur saumon) est inactivé dans la vacuole après avoir été modifié par des enzymes de phase I (laccase), II (UGT) et transporté des protéines de phase III (ABC). Les protéines impliquées dans la neutralisation des xénobiotiques sont symbolisées par des encadrés jaune/orangé. Les EORs sont représentées par $H_2O_2$. Alors qu'il est notamment

produit par des SOD et NOX (encadrés turquoise), $H_2O_2$ est neutralisé par plusieurs enzymes (encadré violet). ABC : transporteur de type ATP Binding Cassette ; Asc : ascorbate ; APX : ascorbate peroxydase ; CAT : catalase ; FAD : flavine adénine dinucléotide ; GPXL : glutathion peroxydase-like ; MDHA : monodéshydroascorbate ; NOX : NADPH oxydase ; PRX : peroxydase de type III ; PRX : peroxyrédoxine ; SOD : superoxyde dismutase ; UGT : glycosyltransférases dépendantes de l'UDP-glucose. Encadré violet : enzymes neutralisant $H_2O_2$ ; encadré turquoise : enzymes produisant $H_2O_2$ ; cercle orange : aquaporines transportant $H_2O_2$ ; cercle violet : transporteur $H_2O_2$ non confirmé. Trait plein : réaction ; trait pointillé/discontinu : transport.

La dernière classe d'enzymes impliqués dans la neutralisation des EORs est celle des protéines à repliement thiorédoxine. Cette superfamille étant très diverse, je me focaliserai uniquement sur les familles d'enzymes en relation avec la détoxication des EORs dans le paragraphe suivant à savoir les thiorédoxines (TRXs), les glutarédoxines (GRXs), les peroxyrédoxines (PRXs), les glutathion transférases (GSTs) et les glutathion peroxydases-like (GPXLs). Ces protéines à repliement thiorédoxine possèdent des propriétés d'oxydoréduction liées notamment à la présence d'un résidu cystéine (thiolate) réactif. Ces protéines sont impliquées dans des échanges thiol-disulfure. Les GPXLs et PRXs réduisent le peroxyde d'hydrogène en eau à l'aide d'une ou plusieurs cystéines catalytiques. Elles sont ainsi dépendantes des TRXs pour leur régénération mais également du GSH ou des GRXs dans le cas de certaines PRXs . Les PRXs et GPXLs sont souvent retrouvées dans les mêmes compartiments (cytosol, noyau, mitochondrie ou chloroplaste) mais peuvent également avoir des localisations subcellulaires propres. Ainsi certaines GPXLs sont localisées dans le réticulum endoplasmique et au niveau de la membrane plasmique alors que certaines PRXs sont exprimées dans l'apoplaste (Smirnoff et Arnaud 2019). Concernant les GSTs, elles sont majoritairement responsables des activités de réduction glutathion-dépendante des peroxydes et il y aussi l'exemple des DHARs qui participent au recyclage de l'ascorbate dans le cycle ascorbate/glutathion.

## B. La détoxication des endo- et/ou xénobiotiques

D'après la définition du dictionnaire Larousse, un xénobiotique est une « molécule étrangère à un organisme vivant et considérée comme toxique ». Ce terme est à distinguer de celui d'endobiotique, qui correspond à une molécule produite par la cellule et qui, pour certaines, deviennent toxiques pour la cellule, à forte concentration.

### 1. La détoxication des xénobiotiques à l'aide du xénome

Chez les plantes, la détoxication des endo/xénobiotiques est généralement réalisée entre le réticulum endoplasmique, le cytosol et la vacuole (Kreuz *et al.,* 1996) et vise à neutraliser les effets toxiques de ces composés. Ce mécanisme en trois étapes est schématisé en figure 5. Les endo/xénobiotiques sont pour la plupart des molécules hydrophobes qui peuvent traverser les membranes biologiques. La première étape encore appelée phase I ou phase d'activation consiste en l'incorporation de groupements fonctionnels (hydroxyle) ou en l'exposition de ces derniers à la surface de l'endo/xénobiotique (réaction d'oxydo-réduction, déshalogénation, hydrolyse, …). La présentation de ces groupements peut dans certains cas augmenter la toxicité/réactivité de l'endo/xénobiotique. Lorsqu'un composé toxique présente déjà un groupement fonctionnel activé, cette phase I peut être facultative. Dans ce cas, ce composé peut alors entrer directement en phase II ou phase de conjugaison. Cette seconde phase consiste en l'addition d'un groupement fonctionnel (acétyle, méthyle, adduit glutathion ou glucuronate pour ne citer que quelques exemples) sur l'endo/xénobiotique activé. Si des groupements carboxyle, sulfhydryle, aminé et hydroxyle verront l'ajout d'un glucose ou d'un malonate, pour les deux derniers les groupements électrophiles du

composé toxique subiront une conjugaison avec du GSH (Lamoureux *et al.*, 1991; Coleman *et al.*, 1997). Cette seconde phase a pour objectif de diminuer la réactivité et d'augmenter la solubilité de l'endo/xénobiotique. En rendant le composé toxique plus soluble, les enzymes de phase II diminuent la capacité de ce dernier à diffuser au travers des membranes, limitant ainsi sa propagation au sein de la cellule (Coleman *et al.*, 1997). Cette étape permet également de faciliter la reconnaissance et le transport du composé toxique lors de la phase III. Cette dernière phase encore appelée phase de transport aboutit à la séquestration du xénobiotique dans la vacuole ou la paroi cellulaire/apoplaste chez les plantes et les champignons ou à l'excrétion de la molécule hors de la cellule chez les animaux (Coleman *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010; Morel *et al.*, 2013). De par la nature diverse des composés à détoxiquer, les acteurs moléculaires intervenant dans ce processus sont nombreux et constituent le xénome (Morel *et al.*, 2013; Labrou *et al.*, 2015). Certains d'entre eux seront présentés dans les paragraphes suivants.

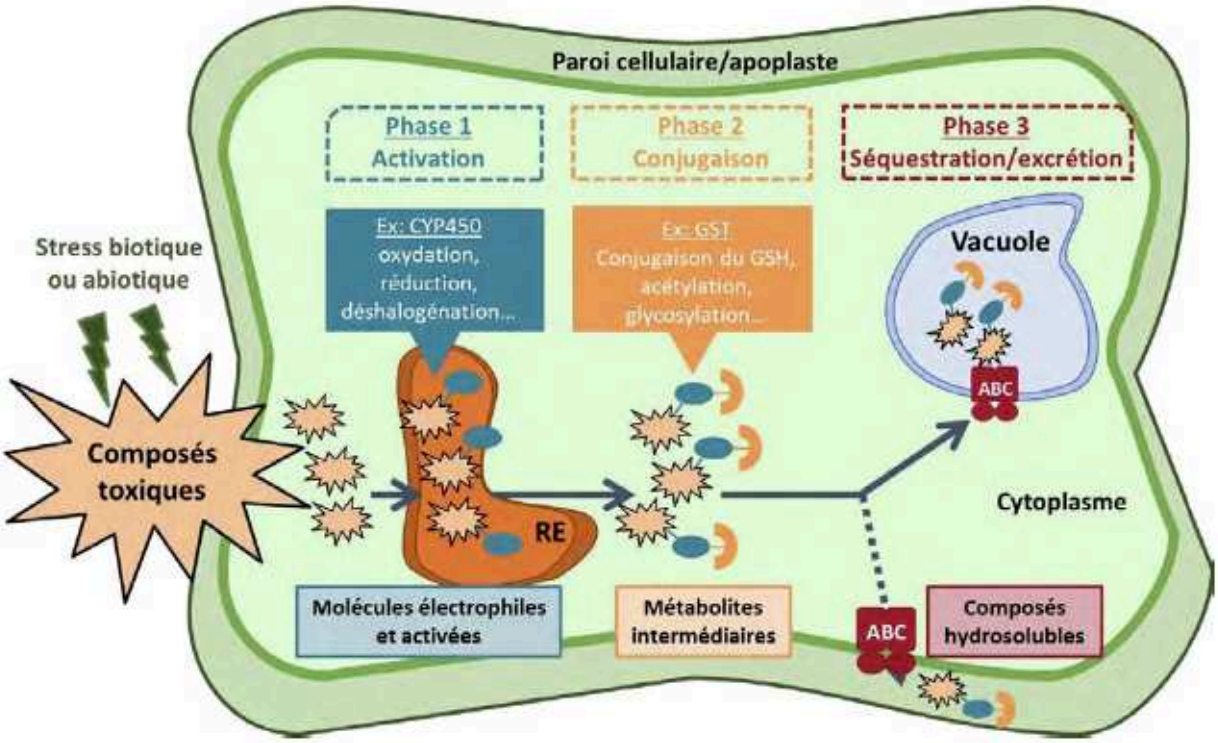



**Figure 5 : Système de détoxication chez les plantes (Adaptée de Morel *et al.*, 2013).**
La détoxication de xénobiotiques se déroule en trois étapes chez les plantes. Lors de la phase d'activation, des enzymes de type monooxygénases (cytochrome P450 ou CYP450) incorporent des groupements électrophiles à la surface du composé toxique. Une fois activé, ce dernier subit une étape de conjugaison où, par exemple, des glutathion transférases catalysent la conjugaison du glutathion (GSH). Cette étape rend le composé plus soluble, ce qui lui permettra d'être séquestré dans la vacuole lors de la troisième et dernière étape grâce à des transporteurs de la famille ABC (ATP binding cassette). Les composés toxiques sont représentés par les symboles de couleur saumon aux contours noirs. L'ovale bleu représente le groupement fonctionnel électrophile. Le demi-cercle orange correspond à l'adduit GSH dans l'exemple présenté. RE : réticulum endoplasmique, GST : glutathion transférase.

## 2. Quelques protéines impliquées dans la détoxication cellulaire

### *a. Enzymes de phase I*

Les réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, d'hydroxylation, de déshalogénation ou d'époxydation catalysées en phase I sont réalisées par des enzymes dites de phase I. Ce groupe

d'enzymes comprend notamment des peroxydases, des alcool déshydrogénases, des laccases, des cytochromes P450 monooxygénases (CYP450), des estérases ou des flavine monooxygénases (FMO).

Parmi les enzymes de phase I, les cytochromes P450 (CYP450) sont les plus représentés. Ces enzymes représentent aujourd'hui la troisième plus grande famille multigénique chez les plantes et permettent d'accommoder de nombreux substrats (Coleman *et al.,* 1997; Bathe et Tissier 2019). Présents dans tous les règnes du vivant, les CYP450 ont été découverts pour la première fois dans les microsomes de foie de lapin (Omura et Sato 1962). A eux seuls, les CYP450 peuvent réaliser chez les plantes de nombreux types de réactions telles que des oxydations, des hydroxylations, des époxydations, des désalkylations, des sulfoxydations ou encore des déméthylations (Hendry 1986; Morel *et al.,* 2013; Bathe et Tissier 2019).
Les CYP450 opèrent le plus souvent des réactions d'hydroxylation ou de désalkylation sur les herbicides (Kreuz *et al.,* 1996). Ces enzymes appartiennent à la classe des hémoprotéines (métalloprotéines liant un hème) et plus particulièrement au groupe des hèmes-thiolates. La liaison de l'hème aux hèmes-thiolates est réalisée par l'intermédiaire de résidus cystéinyls de ces protéines (Omura 2005). Les CYP450 monooxygénases ont une forte affinité pour les composés apolaires qui sont des molécules se dissolvant peu dans les solvants polaires tels que l'eau. Plus ces composés sont hydrophobes et plus la réaction catalysée par ces CYP450 sera rapide (Zaalishvili *et al.,* 2000). De par leurs localisations subcellulaires multiples, ces enzymes sont impliqués dans de nombreux processus biologiques dont notamment les métabolismes général et spécialisé et la détoxication (Morel *et al.,* 2013). Les CYP450, sont associés aux membranes (réticulum endoplasmique, plastes) chez les plantes ou localisés dans le cytosol chez la bactérie (Sakaguchi *et al.,* 1992; Munro et Lindsay 1996; Zaalishvili *et al.,* 2000; Bak *et al.,* 2011). Les CYP450 réductases (CPR) interviennent dans la chaine de transport des électrons en transférant aux CYP450 2 électrons provenant du co-facteur NAD(P)H et du dioxygène (Haubruge et Amichot 1998; Bathe et Tissier 2019). Ces enzymes sont également impliqués dans la biosynthèse de composés organiques tels que les phénylpropanoïdes, les terpènes, les acides gras ou encore les glucosides cyanogènes (Durst et O'Keefe 1995; Bathe et Tissier 2019). Il a récemment été montré que la 13-lipooxygénase (LOX2), l'allène oxyde synthase (AOS) et l'allène oxyde cyclase (AOC2) *d'Arabidopsis thaliana* interviennent dans la biosynthèse de l'acide jasmonique. Ces CYP450 chloroplastiques sont dites non-canoniques car elles n'utilisent ni le NADPH ni l'$O_2$ lors de la catalyse mais emploient l'acide 13-hydroperoxy-9,11,15-octadécatriénoïque (13-HPOT) et ses dérivés comme substrats (Rustgi *et al.,* 2019).

Les laccases représentent une famille particulière au sein des protéines de phase I. Ces enzymes sont retrouvées chez les bactéries, les champignons, les insectes et les plantes (Yang *et al.,* 2017). Les laccases sont des métalloprotéines à cuivre (4 ions $Cu^{2+}$) (multicopper oxidase ou MCO) (Yang *et al.,* 2017; Janusz *et al.,* 2020). Chez les champignons chez qui elles ont été largement étudiées, les laccases sont sécrétées et donc retrouvées hors de la cellule. Si, à ma connaissance, aucune donnée expérimentale ne confirme la localisation exacte des laccases chez les plantes, celles d'*Arabidopsis thaliana* seraient exprimées dans l'apoplaste ou le plasmalemme. Les laccases ont été découvertes pour la 1ère fois dans des exsudats de l'arbre Vernis du Japon (*Toxicodendron vernicifluum*) en 1883 (Alcalde 2007). A cette époque le terme laccase n'était pas employé. On parlait alors de « diastase » capable d'oxyder l'acide urushique en acide oxy-urushique en présence d'oxygène et d'humidité (Yoshida 1883). Depuis cette période, les études concernant les laccases présentes chez les plantes restent rares. Les laccases de plantes partagent de nombreuses similarités avec celles de champignons d'un point de vue architecture moléculaire et mécanistique réactionnelle. Ceci suggère qu'à l'instar des laccases de champignons ou de métazoaires, les laccases de plantes participeraient à la détoxication des composés toxiques (Arregui *et al.,* 2019; Janusz *et al.,* 2020). Il a d'ailleurs été rapporté que certaines laccases du riz interviennent dans le catabolisme ou la détoxication d'herbicides, même si leur rôle exact n'est pas

clairement démontré (Huang *et al.,* 2016). Cela expliquerait que certaines molécules subissent directement la phase de conjugaison à l'intérieur de la cellule. Les laccases appartiennent à une famille multigénique chez les plantes. S'il existe une vingtaine de gènes codant des laccases chez *Oryza sativa* et *Arabidopsis thaliana*, plus de 80 gènes sont retrouvés chez le coton (*Gossypium hirsutum*) (Yang *et al.,* 2017). Le nombre important d'isoformes chez les plantes, supérieur à celui des champignons, pourrait expliquer la variété de substrats modifiés par ces enzymes. A ce jour il est reconnu que les laccases de plantes interviennent dans la détoxication des polyphénols, molécules qu'elles oxydent tout comme les amines aromatiques et aliphatiques, les hydroxyindoles ou encore les hétérosides (Yang *et al.,* 2017; Janusz *et al.,* 2020). Elles prennent également part à la synthèse et la dégradation des pigments et jouent un rôle dans l'élongation des racines et la réponse aux stress (Yang *et al.,* 2017). Les laccases fongiques et de plantes sont impliquées dans la synthèse de la lignine (Bourbonnais *et al.,* 1995; Yang *et al.,* 2017). De par la variété de substrats qu'elles reconnaissent et leur fonction dans la détoxication, les laccases sont utilisées comme sources potentielles de décontamination des eaux polluées (Arregui *et al.,* 2019).

### *b. Enzymes de phase 2*

Durant la phase II, les réactions de conjugaison du GSH, d'acétylation, d'acylation, de méthylation, d'hydratation ou de glycosylation sont entre autres catalysées par les glutathion transférases, les malonyltransférases, les glycosyltransférases et les acyl/acétyltransferases. Certaines de ces réactions sont relativement bien documentées chez les mammifères ou les champignons comme la glucuronidation ou la sulfoconjugaison. Au contraire, chez les plantes, la conjugaison d'un ion sulfate sur un substrat ou sulfo-conjugaison est peu décrite (Chen *et al.,* 2015). D'autres réactions, à l'inverse, sont clairement identifiées chez les plantes comme la glycosylation réalisée par des glycosyltransférases dépendantes de l'UDP-glucose ou UGTs.

Les UGTs appartiennent à la superfamille des glycosyltransférases. Elles sont présentes dans tous les règnes du vivant. A titre d'exemple, l'analyse de plusieurs génomes de plantes a conduit à l'identification de plus de 1500 UGTs potentielles (Caputi *et al.,* 2012). Le nombre important d'isoformes au sein d'un organisme peut s'expliquer par la spécificité de substrat, ces enzymes utilisant un nombre important de molécules (Brazier-Hicks *et al.,* 2018). Les UGT de mammifères transfèrent une molécule d'acide glucuronique sur les composés activés en phase I (on parle de glucurono-conjugaison) (Bock 2016; Kaur *et al.,* 2020) alors que chez les plantes, elle n'est présente que chez quelques espèces (Huber *et al.,* 2012). En effet, les UGTs de plantes utilisent plutôt le glucose comme substrat. En outre, les UGTs de mammifères et d'insectes contiennent un domaine transmembranaire pour une association au réticulum endoplasmique alors que celles de plantes et de bactéries ne possèdent pas ce domaine et sont retrouvées dans le cytosol (Bock 2016). Les familles des UGTs sont très conservées chez les plantes. Les UGTs peuvent être classées en différents groupes selon des critères phylogénétiques (Caputi *et al.,* 2012; Bock 2016). Les UGTs de plantes sont impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes (Kreuz *et al.,* 1996; Bock 2016). Un des exemples bien documenté concerne celui de la glycosylation de la quercétine. La quercétine glycosylée contribue au rétrocontrôle négatif de la synthèse de flavonoïdes en inhibant la phénylalanine-ammonia-lyase, l'enzyme catalysant la conversion de la phénylalanine en acide cinnamique (précurseur des composés phénoliques) (Yin *et al.,* 2012). En plus de permettre la détoxication des flavonoïdes, cette conjugaison stabilise les pigments et autres attractants des insectes (Bock 2016). Les UGTs de plantes interviennent également dans la biosynthèse des acides salicyliques glucosides, des glucosides cyanogènes, des glucosinolates ou des glycoalcaloïdes, des molécules de défense synthétisées en réponse à un stress (Kreuz *et al.,* 1996). Il a été montré que des glycosyltransférases de plantes sont capables de glycosyler le diclofénac (anti-inflammatoire non stéroïdien prescrit chez l'homme et les animaux en cas de douleurs liées à des inflammations articulaires, à de l'arthrose ou en cas de sciatique), après que celui-ci ait été hydroxylé

(Huber *et al.,* 2012). Chez l'homme le diclofénac subit une réaction de glucurono-conjugaison en phase II de détoxication.

L'autre exemple type est celui des glutathion transférases. Ces dernières seront largement décrites dans le chapitre II. Je n'aborderai ici que quelques éléments liés à la détoxication. Les GSTs catalysent la conjugaison d'une molécule de GSH sur les groupements électrophiles de composés activés. Lorsque ces groupements électrophiles sont faibles, le GSH peut s'y conjuguer spontanément. Dans ce cas les GSTs, en tant que catalyseurs, faciliteront la réaction chimique. Lorsque les groupements électrophiles sont forts, la réaction de conjugaison de GSH nécessite l'action de GSTs (Coleman *et al.,* 1997). Ce sont essentiellement les GSTs à sérine et tyrosine conservées qui sont impliquées dans la détoxication des endo/xénobiotiques du fait du type de réaction catalysée (voir chapitre II). De par la diversité de leurs isoformes, les GSTs modifient une grande variété de substrats. Les GSTs qui interviennent dans les mécanismes de détoxication étant pour la plupart cytosoliques, la conjugaison de GSH sur l'endo/xénobiotique se déroule au sein du cytosol.

### *c. Protéines de phase III : les transporteurs*

La neutralisation du composé précédemment toxique se déroule dans la vacuole ou la paroi cellulaire. Du fait du pH du cytosol, les conjugués glutathionylés ou glycosylés auront une charge nette globale neutre. Ainsi, ces conjugués polaires nécessitent l'action d'un transporteur pour pénétrer au sein de leur compartiment final. Ce transport actif est réalisé essentiellement par des transporteurs de type ABC ou ATP binding cassette (Coleman *et al.,* 1997; Keppler 1999; Shoji 2014).

Les transporteurs ABC appartiennent à la superfamille des transporteurs multidrogues (figure 6). Les transporteurs de type ABC sont des ATPases membranaires transportant un type de molécules à la fois. Ce transport nécessite un apport énergétique provenant de l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Moriyama *et al.,* 2008). La famille des transporteurs ABC est elle-même subdivisée en plusieurs classes. Les plus connues concernent les sous-classes PDR (pleiotropic drug resistance), MDR (multidrug resistance) et MRP (multidrug resistance associated protein). Ces classes interviennent aussi bien dans la détoxication cellulaire (phase III) que dans le métabolisme spécialisé (Keppler 1999; Remy et Duque 2014; Shoji 2014). Ainsi certains transporteurs MRPs sont impliqués dans le transport de flavonoïdes (Shoji 2014) alors que d'autres, PDR9 et PDR11, jouent respectivement un rôle dans le transport extracellulaire des coumarines et la résistance au paraquat (herbicide) chez *Arabidopsis thaliana* (Fourcroy *et al.,* 2014; 2016; Shoji 2014).

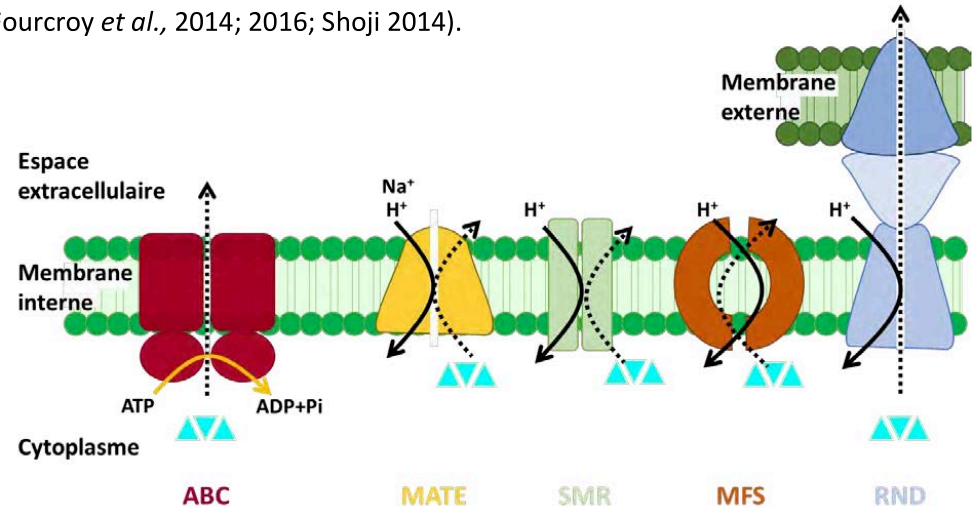



**Figure 6 : La superfamille des transporteurs multidrogues (Adaptée de Moriyama *et al.*, 2008).**
La superfamille des transporteurs multidrogues contient au moins 5 familles retrouvées chez les procaryotes et les eucaryotes. Il s'agit des transporteurs actifs de type ABC (ATP Binding Cassette) (violine) et des transporteurs passifs de type MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) (jaune), SMR (Small Multidrug Resistance) (vert), MFS (Major Facilitator Superfamily) (marron) et RND (Resistance Nodulation cell Division) (bleu). Les triangles turquoise représentent la molécule à transporter.

Les transporteurs MATE sont également impliqués dans la détoxication des xénobiotiques. Ces transporteurs utilisent le potentiel électrochimique membranaire (gradient électrochimique de protons) pour transporter des molécules (figure 6) (Moriyama *et al.,* 2008). Chez *Arabidopsis thaliana* les transporteurs DTX1 (detoxification1) et ALF5 (aberrant lateral root formation5) sont connus pour intervenir dans la détoxication des xénobiotiques (Shoji 2014). Le transporteur vacuolaire MATE TT12 d'*Arabidopsis thaliana* est impliqué dans l'accumulation vacuolaire de flavonoïdes (antiport $H^+$/proanthocyanes) (Marinova *et al.,* 2007). Ainsi un nombre non négligeable de protéines impliquées dans le mécanisme de détoxication des endo/ xénobiotiques l'est également dans le métabolisme spécialisé.

Certains ions métalliques toxiques sont pris en charge par des phytochélatines. Ces ligands protéiques (polymères de glutathion) vont chélater les ions métalliques puis le complexe sera transféré vers les transporteurs ABC présents au niveau des tonoplastes (Ameen *et al.,* 2019).

Comme nous venons de le voir, le xénome est constitué d'un grand nombre de protéines. Dans ce second et dernier chapitre je me focaliserai uniquement sur la superfamille des GSTs.

# Chapitre II : les glutathion transférases

Comme leur nom le suggère, les glutathion transférases (E.C. 2.5.1.18 ; anciennement glutathion S-transférases) ou GSTs ont la capacité de transférer une molécule de GSH vers, ou à partir d'une autre molécule et réalisent ainsi des réactions dites de conjugaison du glutathion ou de déglutathionylation respectivement. Les GSTs appartiennent à une famille d'enzyme multigénique présente chez tous les organismes vivants aérobies. On estime l'apparition des GSTs à plus de 2,5 milliards d'années puisqu'on leur trouve des homologues chez les bactéries (eubactéries et archaebactéries) (Pearson 2005).

La classification des GSTs n'a cessé d'évoluer pour conduire à la classification que l'on connait actuellement. De nos jours, il est communément admis que les GSTs appartiennent soit à la classe des GSTs solubles soit à celle des GSTs mitochondriales (GSTs Kappa) ou encore à la famille des MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoids and Glutathione metabolism) (Kraus 1980; Hayes et Pulford 1995). Deux autres appellations sont également utilisées pour qualifier les GSTs solubles, il s'agit des termes canoniques et cytosoliques, le premier faisant référence à la structure des GSTs et le second à la localisation subcellulaire de ces protéines. Cependant l'emploi du terme cytosolique est inadapté car certaines GSTs présentent des localisations subcellulaires multiples (noyau, mitochondrie, chloroplaste ou peroxysome). En effet, certaines GSTs prédites comme étant cytosoliques présentent des extensions N- ou C-terminales permettant un adressage vers un ou plusieurs compartiments cellulaires (Dixon *et al.,* 2002a, b). Pour ne citer que quelques exemples, la DHAR1 d'*Arabidopsis thaliana* est présente dans le cytosol mais aussi dans le peroxysome et la mitochondrie (Chew *et al.*, 2003; Reumann *et al.*, 2009). Les GST thêta 1 et 2 de souris sont retrouvées dans les noyaux des hépatocytes ; les GSTL2 et DHAR3 d'A. thaliana sont chloroplastiques (Dixon *et al.*, 2009; Lallement *et al.*, 2014b). Dans la suite du manuscrit les termes solubles et canoniques seront utilisés indifféremment l'un pour l'autre.

## A. Présentation générale de la structure des GSTs canoniques

### 1. Les GSTs dimériques

Une GST canonique (GST soluble) se caractérise par la présence de deux domaines structuraux et est le plus souvent retrouvée sous forme dimérique ; à l'exception de quelques exemples qui seront présentés ci-après. Chacun des monomères, d'une masse d'environ 23 à 38 kDa, est constitué d'un domaine N-terminal globalement conservé adoptant un repliement de type thiorédoxine à 4 brins β pris en sandwich par 3 hélices α selon l'enchaînement β1α1β2α2β3β4α3 et un domaine C-terminal tout hélice alpha moins conservé (Board *et al.*, 2000). Une représentation structurale et topologique des GSTs canoniques est présentée en figure 7.

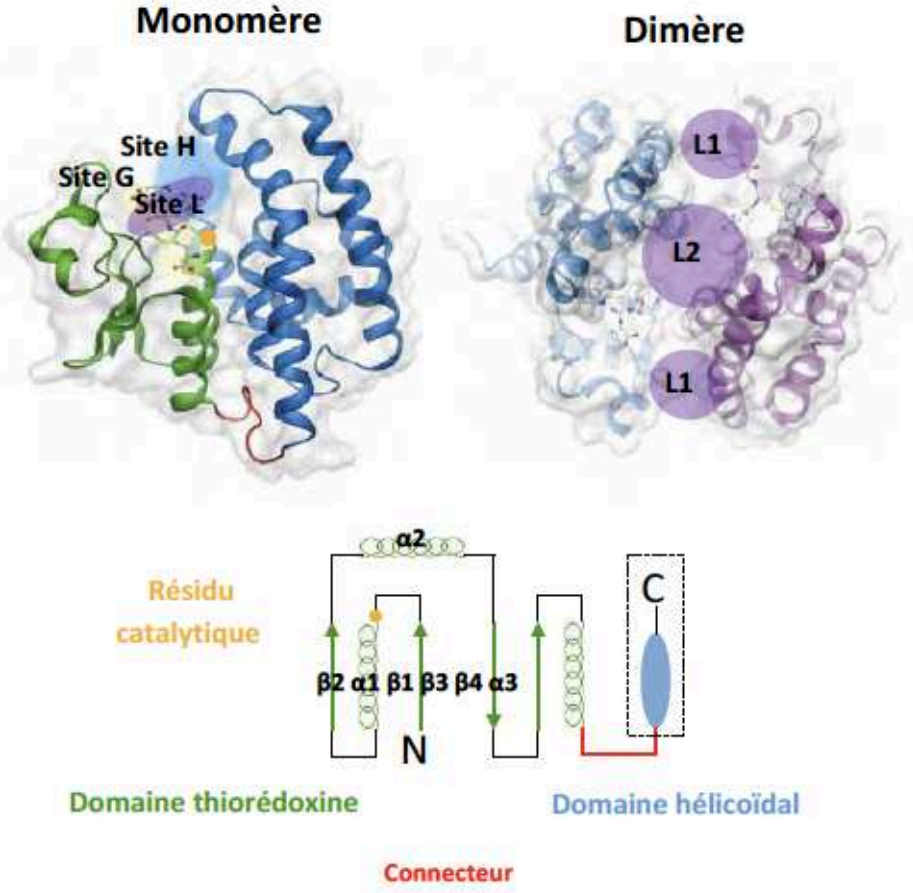



**Figure 7 : Représentations structurale et topologique des GSTs canoniques (Adaptée de Dixon *et al.*, 2002b).**

Les glutathion S-transférases canoniques peuvent être mono- ou dimériques. Elles sont composées de deux domaines : un domaine N-terminal de type thiorédoxine (vert) et d'un domaine C-terminal hélicoïdal (bleu). Le résidu catalytique (orange) se situe dans la partie N-terminale de l'hélice α1 ou à l'extrémité C-terminale du brin β1. Le site actif est formé du site G ou site de fixation du glutathion et du site H ou site de fixation du co-substrat hydrophobe. Un troisième site, site L ou site ligandine, permet la fixation de ligands. Plusieurs sites L (un site L2 et deux L1) ont été décrits à l'intersection des deux monomères (GSTF1 de maïs, pdb 1BYE).

Les domaines N- et C-terminaux participent à la formation du site actif de l'enzyme, lui-même constitué de deux sites adjacents appelés sites G et H. Ce site actif est impliqué dans la liaison du glutathion (site

G) par l'intermédiaire de résidus provenant essentiellement du domaine N-terminal et dans la fixation de substrats hydrophobes (site H) au travers d'une poche hydrophobe constituée par des résidus issus des deux domaines. En sus, certaines GSTs possèdent un troisième type de site de fixation responsable de la liaison de ligands (site L). Ces sites L ou sites ligandins peuvent se trouver au niveau de l'interface de dimérisation de l'enzyme ou à proximité des sites G et H. Les sites L participent à la fonction ligandine des GSTs. Cette capacité de stockage et/ou transport de ligand est notamment impliquée dans le mécanisme de détoxication et le métabolisme spécialisé. La structure de ces enzymes sera détaillée dans une revue sur les GSTs à sérine de plantes, présentée à la fin de ce chapitre. Outre l'importance des structures secondaire et tertiaire pour qualifier les GSTs de canoniques ou autres, la structure primaire de ces protéines conditionne l'appartenance des enzymes à une classe spécifique de GSTs. Ainsi (i) deux GSTs appartiennent à la même classe si elles partagent plus de 40% d'identité de séquence, (ii) si elles partagent moins de 25% chez les mammifères ou moins de 20% d'identité de séquence chez les plantes elles appartiennent alors à des classes distinctes, (iii) si le pourcentage d'identité de séquence est compris entre 20 et 40%, d'autres paramètres doivent être utilisés tels que la structure des gènes (taille et position des introns et des exons) ou encore le profil d'activité enzymatique (Jacquot *et al.,* 2013).

### 2. Certaines GSTs canoniques comportent des spécificités structurales

Bien qu'elles comportent les domaines N- et C-terminaux typiques des GSTs solubles décrits ci-dessus, certaines GSTs canoniques ne sont pas dimériques. Ainsi Fyfe et ses co-auteurs ont résolu la structure de TDR1, une GST cytosolique trimérique de *Leishmania infantum* en 2012. Cette enzyme également présente chez le parasite *Trypanosoma cruzi* est impliquée dans la réduction glutathion-dépendante de l'antimoine pentavalent. TDR1forme un prisme triangulaire où chaque sous-unité est formée par deux domaines de type GST canonique appelés domaine I et II. La particularité vient du fait qu'une sous-unité est composée du domaine I de cette sous-unité et du domaine II de la sous-unité adjacente, reliés entre eux par un court connecteur (Fyfe *et al.,* 2012). Cette GST n'a pas été classée et reste à ce jour unique en son genre. Cette enzyme présente des activités typiques de GST à savoir des activités de déglutathionylation, thiol transférase, déshydroascorbate réductase (voir chapitre II paragraphe C.1 : activités des GSTs canoniques) (Denton *et al.,* 2004; Fyfe *et al.,* 2012). Elle intervient dans la détoxication des métaux lourds toxiques et des ROS (Müller *et al.,* 2003).

D'autres encore, sont monomériques à l'instar des classes lambda et déshydroascorbate réductases de plantes dont les caractéristiques seront présentées dans la suite de ce manuscrit.

Dans le cas de certaines GSTs, ce n'est pas leur état oligomérique qui crée une singularité mais la façon dont leurs monomères vont s'associer. En effet l'assemblage des monomères des GHRs est réalisé par leurs domaines C-terminaux.

Les GST canoniques sont les GSTs les plus abondantes. Par ailleurs, du fait de l'absence des classiques domaines N- et C-terminaux ou de par la singularité de ces domaines vis-à-vis des GSTs, certaines de ces protéines sont dites non canoniques. Ainsi avant de m'attarder sur les diverses fonctions des GSTs canoniques, je présenterai en quoi ces GSTs non canoniques sont particulières (relation structure-fonction).

## B. Les GSTs dites non canoniques possèdent des fonctions très spécialisées

Trois grandes classes de GSTs non canoniques sont retrouvées chez les organismes vivants, il s'agit des GSTs kappa, des MAPEG et des FosA.

## 1. Les GST Kappa

Les GSTs kappa sont retrouvées chez les mammifères, les nématodes, les poissons, les mollusques et les bactéries. A l'instar des GSTs canoniques, ces GSTs kappa sont dimériques et possèdent un domaine de type thiorédoxine et un de type tout hélice alpha. Cependant le domaine hélicoïdal des GSTs kappa se situe au sein du domaine thiorédoxine (Robinson *et al.,* 2004) (figure 8).

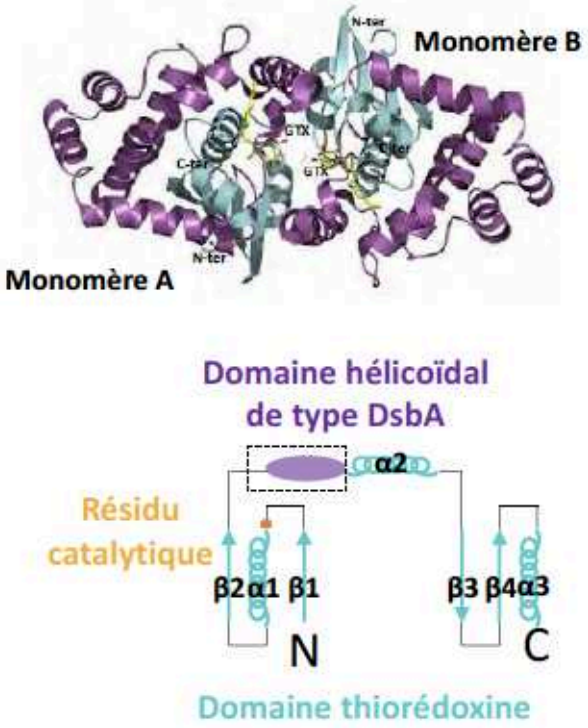



**Figure 8 : Représentations structurale et topologique des GSTs Kappa.**
Les GSTs Kappa sont composées du domaine thiorédoxine (cyan) et d'un domaine hélicoïdal (violet) mais ce dernier est localisé en amont de l'hélice α2 (GST kappa humaine, pdb 3RPN).

Les GSTs kappa sont qualifiées de GST du fait de leur activité de conjugaison de GSH envers le substrat modèle des GSTs, le CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène) et de réduction de peroxydes envers les cumène et tert-butyle hydroperoxydes. Cependant d'un point de vue structural, les GSTs kappa sont plus proches de l'isomérase bactérienne HCCA (2-hydroxychromène-2-carboxylate) ou de l'oxydoréductase bactérienne DsbA (disulphide bond A) que des GSTs canoniques (Ladner *et al.,* 2004; Robinson *et al.,* 2004).

L'étude récente d'une GST kappa de dromadaire a révélé que cette dernière présente une structure homotrimérique rare. Cependant cette affirmation repose essentiellement sur des résultats de filtration sur gel analytique (Malik *et al.,* 2016).

Les GSTs kappa sont également appelées GSTs mitochondriales du fait qu'à l'origine elles ont été isolées de la matrice mitochondriale de cellules de rats (Harris *et al.,* 1991). Néanmoins les GSTs kappa sont aussi bien retrouvées au sein des mitochondries que dans les peroxysomes (Morel et Aninat 2011). Le rôle physiologique des GSTs kappa reste à ce jour sujet à spéculation. Certaines études suggèrent un rôle des GSTs kappa dans le mécanisme de défense contre les EORs du fait de leur localisation dans la matrice mitochondriale. En effet, la mitochondrie est une source majeure de ROS générés par la chaine respiratoire (Jowsey *et al.,* 2003; Petit *et al.,* 2009). Elles pourraient également intervenir dans le métabolisme lipidique du fait de leur présence dans les peroxysomes, sièges de la β-oxydation des acides gras (Petit *et al.,* 2009). Deux études récentes suggèrent l'implication des GSTs

kappa de l'ormeau et de l'hippocampe dans les mécanismes de défense immunologique (Sandamalika *et al.,* 2018; Samaraweera *et al.,* 2019).

## 2. Les protéines MAPEG

La famille de protéines MAPEG (Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) est un groupe de protéines associées à la membrane ayant des fonctions variées. Le terme « MAPEG » désigne des protéines prenant en charge le GSH et des molécules de la famille des éicosanoïdes dont sont issues les prostaglandines (D,E,F,G,H), les leucotriènes ou encore les lipoxines. Elles sont présentes chez les bactéries, les mammifères, les organismes photosynthétiques, les crustacés, les insectes. Plusieurs classifications, plus complexes les unes que les autres, ont été élaborées pour classer ces protéines (Jakobsson *et al.,* 2000; Bresell *et al.,* 2005; Pearson 2005; Frova 2006). Actuellement, les MAPEG regroupent les GSTs microsomales, les prostaglandines E synthétases microsomales (mPGES), les leucotriènes C4 synthétases ($LTC_4$) et les protéines activant la 5-lipoxygénase (FLAP) (Bresell *et al.,* 2005). Les GSTs MAPEG présentent une structure tridimensionnelle très différente des GSTs canonique. Elles adoptent une organisation structurale trimérique et chaque monomère est constitué d'un faisceau transmembranaire à quatre hélices α (figure 9).

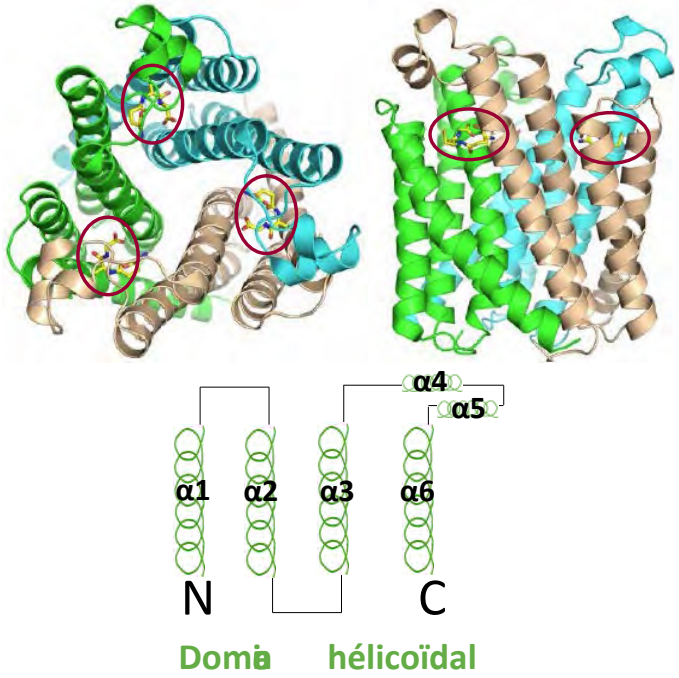



**Figure 9 : Représentations structurale et topologique des MAPEG.**
Les GSTs MAPEG sont trimériques et ne possèdent pas de domaine thiorédoxine caractéristique. Elles sont composées d'un domaine tout hélice α (6 hélices α). Les sites de fixation du glutathion (violet) sont formés par l'association des résidus de deux monomères. Les monomères sont représentés en cyan, vert et marron (mPGES1 humaine, pdb 4AL0).

Les MAPEG peuvent réaliser les activités classiques des GST cytosoliques telles que la conjugaison du GSH, la réduction de peroxydes ou l'activité isomérase (Morgenstern *et al.,* 1984; Frova 2006). Ces protéines protégeraient les membranes et les cellules du stress oxydatif (Morgenstern 2005). Bien que peu d'études aient été réalisées sur les MAPEG des organismes photosynthétiques, une étude *in vivo* récente a montré que la MAPEG de la cyanobactérie *Synechocystis PCC 6803* joue un rôle dans la résistance au stress oxydatif, à la chaleur et au froid. Il a été suggéré que cette protéine pourrait être impliquée dans le maintien de la fluidité membranaire (Kammerscheit *et al.,* 2019).

### 3. Les protéines conférant une résistance à la fosfomycine

Administrée lors d'infections des voies urinaires, la fosfomycine est un antibiotique à large spectre produit par certaines bactéries du genre *Streptomyces* et *Pseudomonas* inhibant la synthèse de la paroi des bactéries Gram négatives. Quelques bactéries Gram négatives telles que *Klebsiella sp.* ont néanmoins développé une résistance (Hirsch *et al.,* 2015). Cette résistance est notamment portée par le gène *fosA* qui code une glutathion transférase cytosolique $Mn^{2+}/K^{+}$-dépendante inactivant la fosfomycine par conjugaison de GSH (Arca *et al.,* 1988; Fillgrove *et al.,* 2007). La majorité des études réalisées sur cette glutathion transférase porte sur l'identification de molécules inhibitrices de cette activité conjugante (Klontz *et al.,* 2017; Tomich *et al.,* 2019) qui pourraient être utilisées lors de l'apparition de résistances dans les infections urinaires d'origine bactérienne.

## C. Les GSTs canoniques sont impliquées dans de nombreux processus biologiques

Les GSTs canoniques représentent les GSTs les plus étudiées de nos jours. Une dizaine d'années après la découverte de l'activité de conjugaison de glutathion des extraits cytosoliques de foie de rat (Booth *et al.,* 1961; Combes et Stakelum 1961), le même type d'activité a été découvert chez des plants de maïs et de sorgho résistants aux herbicides (Frear et Swanson 1970; Lamoureux *et al.,* 1970). Ce n'est que plus tard que cette activité a été attribuée aux GSTs. Ces protéines ont été largement étudiées du fait notamment de leur implication dans la détoxication de nombreux xénobiotiques.

Plusieurs modèles de l'évolution des GSTs canoniques ont vu le jour et tous s'accordent sur le fait que les différentes classes de GSTs canoniques dérivent d'un ancêtre commun de type thiorédoxine ayant un motif catalytique de type CxxC (deux cystéines conservés séparées par deux autres acides aminés). Le modèle le plus largement accepté (Frova 2006) permet une classification de ces GSTs en fonction de la nature des résidus impliqués dans la catalyse (figure 10).

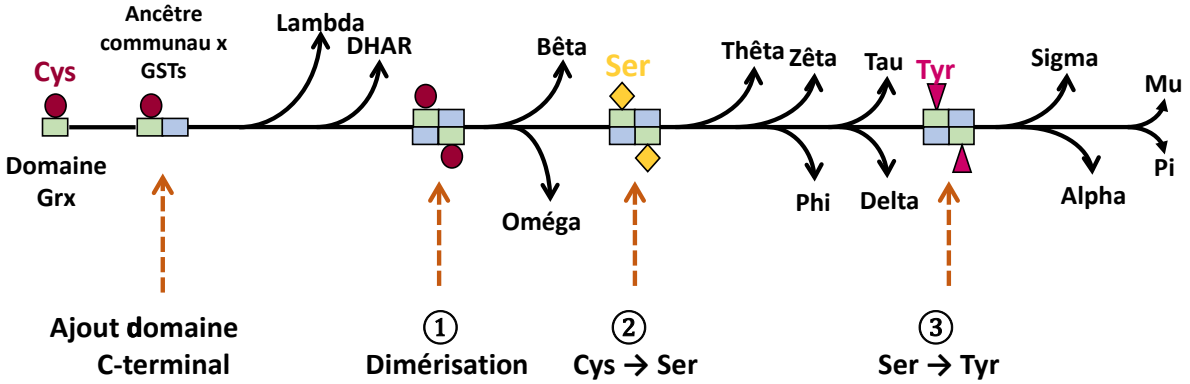



**Figure 10 : Histoire évolutive des GSTs canoniques (Adaptée de Frova 2006).**

Les GSTs ont évolué à partir d'un ancêtre commun de type glutarédoxine (Grx, rectangle vert) auquel a été fusionné en position C-terminale un domaine constitué uniquement d'hélices α (rectangle bleu). Cette GST ancestrale a alors subi une évolution en trois étapes conduisant tout d'abord à sa dimérisation (①) puis à la substitution de la cystéine catalytique en sérine (②) puis enfin à la substitution de cette sérine en tyrosine (③).

Parmi la trentaine de classes de GST identifiées à ce jour, 4 groupes principaux peuvent être identifiés. Le premier concerne les GSTs possédant la cystéine ancestrale conservée et les trois autres pour lesquels la cystéine ancestrale a été substituée au cours de l'évolution par une sérine, une tyrosine ou

d'autres résidus. Ce modèle évolutif laisse néanmoins de nombreuses questions en suspens et mériterait d'être actualisé du fait de l'accumulation régulière de données génomiques, biochimiques et structurales. En effet l'obtention de ces données a révélé de nouvelles classes non incluses à l'époque dans le modèle proposé par Frova. A tire d'exemple, on peut citer les classes rhô, epsilon, sigma, glutathionyl-hydroquinone réductase ou encore un certain nombre de GSTs fongiques. Cependant, je me baserai sur ce modèle évolutif dans la suite de ce chapitre. Un tableau récapitulatif présentant les caractéristiques des différentes classes de GSTs est présenté en annexe (tableau A1).

### 1. Les GSTs sont des enzymes multifonctionnelles

Au cours de l'évolution, la substitution de la cystéine ancestrale en sérine puis en tyrosine a radicalement modifié les propriétés catalytiques des GSTs. En effet, si les GSTs présentant une cystéine catalytique (Cys-GSTs) catalysent des réactions enzymatiques de type thiol-transférase et/ou déglutathionylation, les GSTs à sérine (Ser-GSTs) ou à tyrosine (Tyr-GSTs) conservée catalysent plutôt des réactions de conjugaison du glutathion sur des molécules électrophiles. De plus à la différence des GST à sérine ou tyrosine, la fixation du GSH est covalente chez les GST à cystéine. Cette cystéine catalytique est généralement située autour du résidu 30-35 (Lallement *et al.,* 2014a). Cette réaction de déglutathionylation héritée de la cystéine ancestrale n'est pas sans rappeler celle portée par les glutarédoxines (Rouhier *et al.,* 2008). Outre l'activité de conjugaison, certaines Ser- et Tyr-GSTs portent des activités isomérase et peroxydase (ou réduction de peroxydes). Les principales réactions catalysées par les GSTs canoniques sont présentées en figure 11.

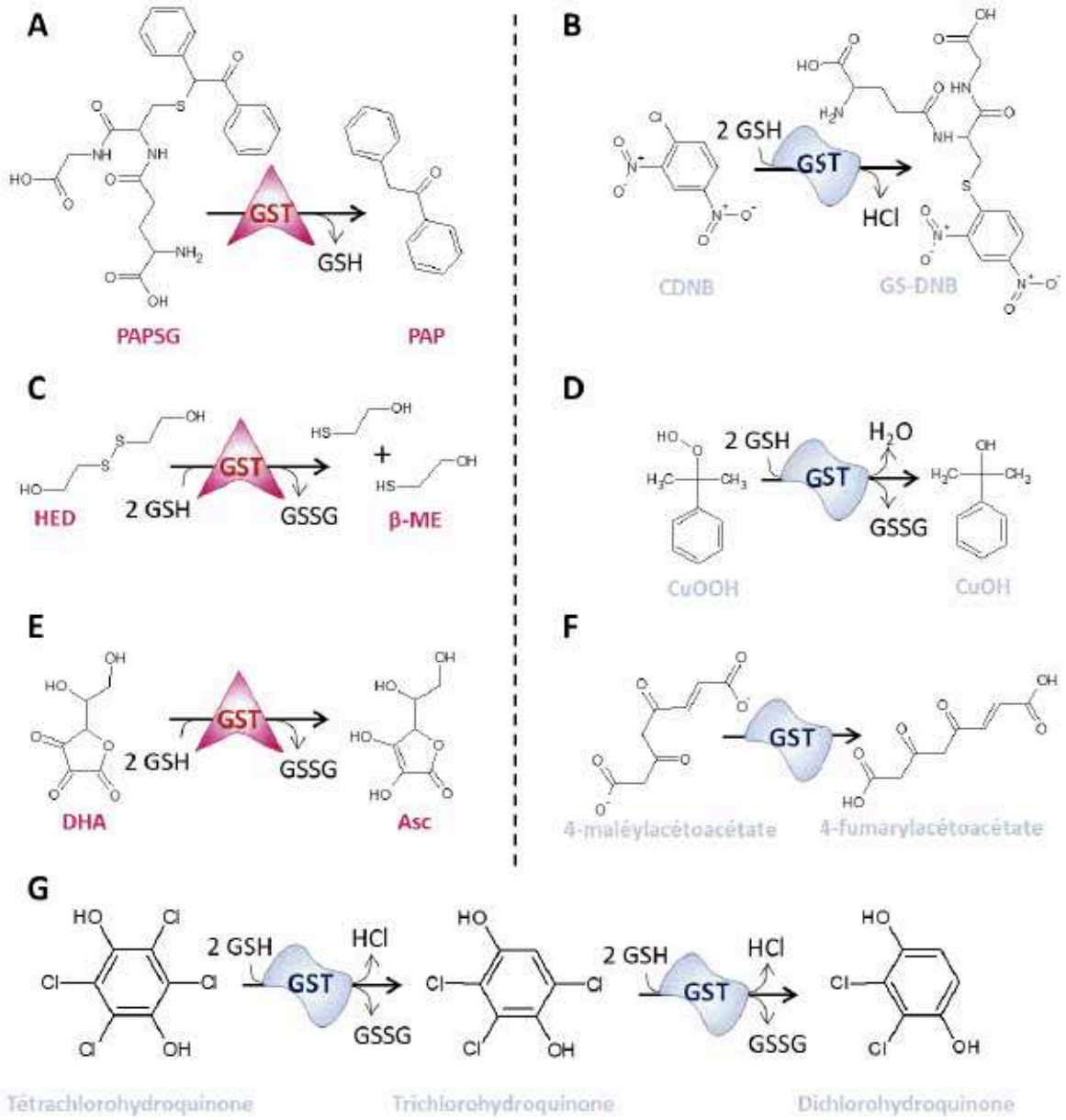



**Figure 11 : Les principales activités portées par les glutathion transférases.**
Les GSTs à cystéine catalytique (forme triangulaire rose) ou à tyrosine/sérine conservée (forme ondulée bleue) possèdent différents types d'activités. Ainsi les Cys-GSTs ont la capacité de déglutathionyler le phénylacétoacétate glutathionylé (PAPSG) pour former du phénylacétoacétate (PAP) (A). Ces enzymes présentent également des activités thiol-transférase (C) et déshydroascorbate réductase (DHAR) (E) envers l'hydroxyéthyl disulfure (HED) et le déshydroascorbate (DHA) respectivement ; après catalyse ces réactions aboutiront à la formation de β-mercaptoéthanol (β-ME) et d'ascorbate (Asc). Les Ser- et Tyr-GSTs possèdent, quant à elles, des activités de conjugaison de GSH (B), de réduction de peroxyde (D), isomérase (F) et de réduction de la tétrahydroquinone (G). Chacune de ces réactions est illustrée par un exemple précis. Une molécule de GSH est conjuguée au 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) pour former du S-glutathionyl-2,4-dinitrobenzène (GS-DNB). Certaines GST catalyseront la réduction du cumène hydroperoxyde (CuOOH) en 1-hydroxycumène (CuOH) alors que d'autre réaliseront l'isomérisation du 4-maléylacétoacétate en 4-fumarylacétoacétate. Enfin un type particulier de GSTs nommées tétrachlorohydroquinone déshalogénase (TCHQD) opère la déhalogénation du tétrachlorohydroquinone (TCHQD). Cette déhalogénation effectuée en deux étapes successives aboutit d'une part à la formation de trichlorohydroquinone qui sera ensuite déhalogéné en dichlorohydroquinone.

## 2. Bien que les GSTs soient ubiquitaires, certaines classes ne sont pas présentes chez les plantes

### *a. Les GSTs à cystéine*

#### (1) GSTs BETA

La classe des GSTs Bêta ou GSTBs est spécifique des bactéries. Généralement constituées d'environ 200 acides aminés, ces protéines sont présentes dans l'espace périplasmique et dans le cytosol (Perito *et al.,* 1996). Cette classe a été introduite pour la première fois en 1998 avec la découverte de la protéine PmGSTB1-1 de *Proteus mirabilis* (Rossjohn *et al.,* 1998). Auparavant, les GSTs de bactéries étaient regroupées sous le terme de GSTs bactériennes sans distinction de classe ou appartenant à la classe Thêta. D'un point de vue structural, bien que le monomère ressemble à celui des autres GSTs canoniques, l'interface de dimérisation est légèrement différente et ne présente pas l'ouverture en forme de V des GSTs (Allocati *et al.,* 2009) (voir chapitre II paragraphe C.3.c, revue). Les GSTBs portent aussi bien les activités des GSTs à cystéines (thiol transférase) que des GSTs à sérine/tyrosine (conjugaison de GSH et réduction de peroxyde) (Perito *et al.,* 1996; Allocati *et al.,* 2000; Caccuri *et al.,* 2002; Federici *et al.,* 2009). La BphK, une GSTB issue de la bactérie *Paraburkholderia xenovorans*, élimine le chlore des métabolites biphenyl polychlorés (Tocheva *et al.,* 2006). Les GSTBs réduisent l'activité antimicrobienne des β-lactames, interviennent dans la détoxication de l'atrazine ou la résistance à l'arsenate et aux antibiotiques (Perito *et al.,* 1996; Allocati *et al.,* 2009; Chrysostomou *et al.,* 2015). Les GSTBs sont capables de lier les antibiotiques sans les transformer au travers de leurs propriétés ligandines (Perito *et al.,* 1996).

#### (2) GST OMEGA

La classe des GST Oméga ou GSTOs est retrouvée chez les mammifères, les champignons, les mollusques, les nématodes et les arthropodes. Les protéines de cette classe contiennent en moyenne 240 acides aminés et sont localisées dans le noyau pour certaines (Whitbread *et al.,* 2005; Board 2011; Brock *et al.,* 2013). Les GSTOs présentent les activités classiquement portées par les Cys-GSTs. A titre d'exemple la GSTO de *S. cerevisiae* porte une activité thiol-transférase (Garcerá *et al.,* 2006) ou encore des GSTOs humaines et fongiques possèdent des activités DHAR et de déglutathionylation (Board et Anders 2007; Board *et al.,* 2008; Meux *et al.,* 2011; 2012; 2013). Plus étonnamment une GSTO de *Bombyx mori* présente une activité de réduction des lipides peroxydés contre le 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Yamamoto *et al.,* 2009). Le 4-HNE est un des produits de l'oxydation des lipides membranaires (acides gras polyinsaturés) par les EORs. Une activité de réduction du monomethylarsonate a été décrite pour les GSTO humaines (Whitbread *et al.,* 2005). Certaines GSTOs de champignons possèdent aussi bien une cystéine qu'une sérine comme résidu conservé au sein de leur motif catalytique (Schwartz *et al.,* 2018). Bien qu'elle soit capable de le déglutathionyler, la GSTO humaine est également capable de lier le 4-nitrophénylacétophone (4NPG) sans le catalyser mettant en avant sa propriété ligandine (Brock *et al.,* 2013). Cette capacité ligandine a également été rapportée chez des GSTOs de champignons décomposeurs de bois (*T. versicolor*) qui lient des polyphénols *in vitro* (Schwartz *et al.,* 2018).

Les GSTOs sont impliquées dans le métabolisme des métabolites spécialisés (flavonoïdes), la réponse au stress oxydant, la détoxication des métaux lourds et la résistance aux insecticides (Meng *et al.,* 2014; Schwartz *et al.,* 2016; Chen *et al.,* 2018). Une protéine de la drosophile identifiée comme une GSTO présente une activité pyrimidodiazépine (PDA) synthétase et serait donc impliquée dans la coloration des yeux de la drosophile (Kim *et al.,* 2006). Une autre GSTO de drosophile est impliquée dans la sensibilité à la sédation à l'alcool. En effet un mutant de cette GSTO montre une forte augmentation à la sensibilité à l'éthanol (Choi et al., 2019).

#### (3) GSTs CLIC

Les GSTs CLIC (chloride intracellular channel) sont présentes chez les mammifères, les poissons et les invertébrés. Elles constituent chez les mammifères, une famille de 6 protéines (en moyenne 250 acides aminés) qui existent sous forme canoniques ou associées à la membrane (Argenzio et Moolenaar 2016). Bien qu'elles portent le nom de canal intracellulaire des ions chlorures, il n'y a aucune évidence d'activité de canal ionique dans des conditions physiologiques. De plus ces protéines sont dépourvues de la séquence signal de localisation à la membrane. *In vitro*, elles peuvent induire un courant artificiel dans les membranes en conditions réductrices et à faible pH. D'un point de vue enzymatique les CLICs montrent des activités thiol-transférases et DHAR (Al Khamici *et al.,* 2015). D'ailleurs du fait de cette activité DHAR, il a été suggéré que les DHAR de plantes étaient des GST CLICs (Elter *et al.,* 2007; Gururaja Rao *et al.,* 2017). L'autre élément venant étayer cette hypothèse est que la DHAR1 d'*Arabidopsis thaliana* fusionnée à la GFP émet un signal fluorescent dans le cytoplasme et dans la fraction microsomale non soluble (Elter *et al.,* 2007). Certaines GSTs CLIC possèdent un résidu aspartate à la place de la traditionnelle cystéine conservée (Littler *et al.,* 2008). D'un point de vue structural la présence d'un site de fixation de métaux a été observée dans la structure de quelques CLICs. Un atome de calcium a été retrouvé dans certaines structures, faisant supposer aux auteurs de cette étude que l'affinité pour ce cation divalent pourrait être élevée. Les GSTs CLIC sont aussi bien retrouvées sous forme dimériques que monomériques (Harrop *et al.,* 2001; Littler *et al.,* 2008; 2010). De nombreux rôles ont été proposés pour ces protéines sans pour autant qu'un rôle physiologique n'émerge. Elles interviendraient dans le trafic vésiculaire et le recyclage de l'intégrine entre autres (Argenzio et Moolenaar 2016).

### *b. Les GSTs à sérine*

#### (1) GST DELTA ET EPSILON

Les GSTs epsilon (GSTE) sont spécifiques des insectes. Les GSTs delta (GSTD), bien que souvent considérées comme spécifiques aux insectes, semblent également être présentes chez les acariens (Liao *et al.,* 2013; Wu et Hoy 2016). Ces protéines contiennent en général 214 acides aminés pour les GSTDs et 224 acides aminés pour les GSTEs (Aravindan *et al.,* 2014; Hu *et al.,* 2020). Les GSTs epsilon et delta possèdent des activités de conjugaison de GSH et de réduction de peroxyde (Sawicki *et al.,* 2003; Lerksuthirat et Ketterman 2008; Pavlidi *et al.,* 2015; Gonzalez *et al.,* 2018; Saruta *et al.,* 2019; Hu *et al.,* 2020) mais également des activités thiol-transférase et isomérase (Saisawang *et al.,* 2012; Škerlová *et al.,* 2020). L'activité CDNB des GSTDs et GSTEs peut être inhibée par des flavonoïdes et autres molécules du goût (Gonzalez *et al.,* 2018) ou encore par différents insecticides (Udomsinprasert et Ketterman 2002; Pavlidi *et al.,* 2015). D'ailleurs les GSTDs et GSTEs sont connues pour être impliquées dans la détoxication des insecticides organochlorés (Ranson *et al.,* 2001; Ortelli *et al.,* 2003; Molin et Mattsson 2008; Bartley *et al.,* 2015; Hu *et al.,* 2020). Des GSTs des classes delta et epsilon sont régulées, aussi bien au niveau transcriptionnel que post-traductionnel, par des molécules comme l'aniline, le paraquat ou le phénobarbital (Tang et Tu 1995; Alias et Clark 2007; Chan *et al.,* 2015). La GSTE14 de *Drosophila melanogaster* interviendrait dans la biosynthèse de la 20-hydroxyecdysone, une hormone de mue des arthopodes (Škerlová *et al.,* 2020). Les GSTDs pourraient impacter de nombreux processus biologiques dépendant de la famille des kinases JNK. En effet, certaines GSTDs inhibent et activent l'activité JNK (c-Jun N-terminal kinase) et inversement ces JNK inhiberaient l'activité de ces mêmes GSTDs (Rungrutai Udomsinprasert *et al.,* 2004; Wongtrakul *et al.,* 2012). Plus généralement, comme de nombreuses GSTs, elles sont impliquées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Yan *et al.,* 2013; Lyu *et al.,* 2016; Zhang *et al.,* 2016).

#### (2) GSTs RHO

Les GSTs rhô ou GSTRs sont spécifiques des poissons et des mollusques. Ces protéines contiennent en moyenne 225 acides aminés. Les GSTRs possèdent des activités de conjugaison du GSH et peroxydase (Fan *et al.,* 2007; Trute *et al.,* 2007; Carletti *et al.,* 2008). L'activité CDNB de la GSTR peut être inhibée par la bilirubine ou l'insecticide parathion méthyl (inhibition de 29 et 12% respectivement) (Trute *et al.*, 2007). La GSTR pourrait ainsi avoir une capacité ligandine envers la bilirubine. Les gènes codant les GSTRs sont surexprimés en réponse à une exposition à des benzo(a)pyrènes. Ces protéines seraient impliquées dans la détoxication de nombreux polluants marins comme les hydrocarbures polycycliques aromatiques (PaH) dont font partie les benzo(a)pyrènes mais également dans la détoxication des métaux lourds, des antibiotiques ou encore des herbicides (Xing *et al.,* 2012; Zhang *et al.,* 2012; Li *et al.,* 2013; Boscolo Papo *et al.,* 2014; Yu *et al.,* 2014; Ni *et al.,* 2019; Zhang *et al.,* 2020). Peu d'informations sont disponibles sur les GSTRs excepté celles en lien avec leur rôle dans la détoxication. Une récente étude propose que les GSTRs puissent également être impliquées dans la stéroïdogenèse et dans le métabolisme des androgènes chez les poissons (Bašica *et al.,* 2019). Deux études, réalisées par les mêmes auteurs, suggèrent l'existence d'une nouvelle classe de GSTs chez *Synechocystis PCC 6803* nommée GST Rhô. L'enzyme étudiée possède des activités semblables à celles portées par les GSTs de la classe Zêta, Thêta et Alpha mais possède peu de similarité de séquence ou structurale avec ces dernières. Les auteurs ont donc choisi de créer une nouvelle classe pour cette enzyme. Cependant, aucun élément ne prouve que les auteurs aient pris en considération l'existence d'une classe rhô chez les poissons et mollusques (Pandey, Chhetri, *et al.,* 2015; Pandey *et al.,* 2017).

En d'autres termes la classe rhô des GSTs de *Synechocystis* n'a aucun lien avec celle des GSTRs de poissons et mollusques traitées dans ce paragraphe.

#### (3) GSTFUA (OU GTE)

Les GSTFuA (pour « Fungal specific GST class A ») sont présentes chez les champignons et les bactéries. Chez les champignons, elles ont d'abord été nommées GTE (glutathione transferase etherase-related) en raison de l'activité éthérase qu'elles portent (Morel *et al.,* 2009). Cependant comme toutes les GTE ne possèdent pas l'activité β-éthérase, elles ont été renommées GSTFuA. Chez les bactéries elles sont souvent retrouvées sous le terme de LigE, LigF ou LigG qui sont des familles d'enzymes dégradant la lignine de façon GSH-dépendante (les autres protéines « Ligs » n'utilisent pas le GSH). Les GSTFuA sont cytosoliques, mitochondriales ou excrétées (Morel *et al.,* 2009). Elles se composent en général de 220 acides aminés (Osman *et al.,* 2018). Une étude récente a révélé qu'une GSTFuA de *Ceriporiopsis subvermispora* ne possédait pas la sérine conservée des GSTFuA, ni une cystéine ou une tyrosine et serait donc une GST atypique (Osman *et al.,* 2019). Outre leur activité de clivage de liaison éther-aryle (β-éthérase) (Osman *et al.,* 2018), les GSTFuA réalisent des activités de conjugaison du GSH, de réduction de peroxyde et estérase (Mathieu *et al.,* 2013; Calmes *et al.,* 2015; Osman *et al.,* 2018; 2019; 2019). Bien que les GSTFuA de *Phanerochaete chrysosorium* ne possèdent pas l'activité β-éthérase, elles sont capables de lier des dérivés de la lignine comme la vanilline, la coniféraldéhyde ou le syringaldéhyde (Mathieu *et al.,* 2012; 2013). Ces enzymes joueraient un rôle dans le recyclage de nutriment dérivés du bois et la détoxication.

### *c. Les GSTs ayant un autre résidu conservé*

#### (1) LES GSTS A TYROSINE (ALPHA, MU, PI ET SIGMA)

Les GSTs des classes Alpha (GSTA), Mu (GSTM), Pi (GSTP) et Sigma (GSTS) ou encore PGDS pour « prostaglandine $D_2$ synthase » possèdent toutes une tyrosine à la place de la cystéine ancestrale. Cette tyrosine, comme la sérine des Ser-GST, permet d'abaisser le pKa de la cystéine du GSH pour que celle-ci soit réactive lors de la catalyse.

Considérées au départ comme spécifiques des mammifères, les classes Alpha, Mu et Pi sont également retrouvées chez les oiseaux et les poissons (GSTA), les arthropodes et les protozoaires (GSTM) et les nématodes (GSTP). Dans ces classes, la tyrosine conservée se trouve généralement en position 7 (Frova 2006) et les protéines contiennent en moyenne 220 acides aminés. Elles sont localisées dans le cytosol mais également dans la mitochondrie (Raza 2011). D'un point de vue structural, ces classes seraient proches de la classe phi avec une interface de dimérisation hydrophobe (Frova 2006). Elles réalisent les fonctions communes aux GSTs à sérine et tyrosine à savoir de conjugaison du GSH, réduction des peroxydes et isomérase (Hayes *et al.,* 2005; Frova 2006; Bunderson *et al.,* 2013). Ces trois classes possèdent également une propriété ligandine. En effet de nombreuses études révèlent que ces GSTs peuvent lier des tétrapyrroles comme la bilirubine ou d'autres dérivés d'hèmes (Sylvestre-Gonon *et al.,* 2020). Elles ont souvent été étudiées pour leur rôle dans la détection de maladies en tant que biomarqueurs ou dans la résistance aux médicaments anticancéreux (Lewis *et al.,* 1988; Waxman 1990; Clarke *et al.,* 1997; Chatterjee et Gupta 2018; Lin *et al.,* 2018; Zou *et al.,* 2018). Il a été proposé qu'elles inhibent la voie des protéines kinases mitogen-activated (MAPK) (Townsend et Tew 2003) ou pourraient agir comme des enzymes classiques de la détoxication. Elles sont responsables de la modulation de nombreux signaux cellulaires. Un exemple récent est celui de leur implication dans la perception olfactive chez les lapereaux. En effet, une activité de conjugaison de GSH GST-dépendante a été mesurée contre le 2-methylbut-2-enal (une phéromone présente dans le lait maternel) dans la muqueuse olfactive des lapereaux (Robert-Hazotte *et al.,* 2019). Cette phéromone est notamment impliquée dans le mouvement orocéphalique des lapereaux lors de la tétée.
Les GSTAs sont capables de catalyser l'isomérisation des stéroïdes et la réduction d'hydroperoxydes dérivés de l'acide linoléique (HIRATSUKA *et al.,* 2000; Johansson et Mannervik 2002; Prabhu *et al.,* 2004; Lindström *et al.,* 2018). Elles interviendraient donc dans la stéroïdogenèse et le métabolisme des acides gras.
Les GSTMs seraient impliquées dans la résistance aux cirrhoses hépatiques non virales. En effet un mutant GSTM1-/- augmenterait la susceptibilité à développer ce type de cirrhose chez la population asiatique (Gu *et al.,* 2018).
Les GSTPs interviendraient dans la détoxication des benzo(a)pyrènes (Hu *et al.,* 1997). Une GSTP est décrite pour conjuguer du GSH sur une peroxirédoxine ce qui activeraient de l'activité peroxydase de cette dernière (Manevich *et al.,* 2004; 2013).

La classe des GSTs sigma (GSTS) contient la famille des PGDS ou prostaglandine $D_2$ synthase. Elles sont retrouvées chez les animaux, les insectes, les algues et les vers parasites. Les protéines GSTS contiennent 210 acides aminés en moyenne. Elles ont une activité prostaglandine synthase mais également des activités de conjugaison du GSH, de réduction de peroxyde et présentent une activité isomérase (Jowsey *et al.,* 2001; Agianian *et al.,* 2003; Frova 2006). Une forme de GSTS non active est retrouvée chez les céphalopodes. Cette protéine, appelée S-cristalline, est la protéine majeure du cristallin. La perte d'activité serait due à la présence d'une insertion de 11 acides aminés entre les hélices α4 et α5 (Frova 2006). Chez le parasite *Fasciola hepatica*, la GSTS intervient dans la modulation de la réponse immunitaire (Dowling *et al.,* 2010). Elles sont impliquées dans la détoxication des xénobiotiques dont notamment l'herbicide glyphosate (Zhang *et al.,* 2020) et dans la réponse inflammatoire par leur activité PGDS notamment (Urade et Eguchi 2002; Urade *et al.,* 2004).

#### (2) LES GSTS A ARGININE OU AUTRE RESIDU CONSERVE

Quelques GSTs canoniques ne contiennent aucun des acides aminés conservés conventionnels à savoir une cystéine, une sérine ou une tyrosine. Le résidu en lieu et place des résidus conservés est parfois connu, mais reste souvent hypothétique du fait que certaines classes ne sont représentées que par un seul membre. Les acides aminés constituant le site G participent à l'abaissement du pKa du thiol de la cystéine du glutathion afin que ce dernier se trouve sous la forme de thiolate à pH physiologique. Dans

ce cas, il n'est pas nécessaire d'avoir une sérine ou une tyrosine. Ainsi le groupe des « autres » GSTs comprend les classes chi, eta et GTT.

Bien qu'elle soit mentionnée depuis des années, très peu de choses sont connues sur la classe des GSTs chi (GSTC). Elle serait spécifique des bactéries et serait similaire à la classe bêta. C'est l'absence de la cystéine conservée des GSTBs qui est à l'origine de la création de la classe chi (Wiktelius et Stenberg 2007). Les GSTCs catalysent des réactions de conjugaison de GSH contre les isothiocyanates majoritairement même si de faibles activités CDNB et CuOOH ont été reportées (Wiktelius et Stenberg 2007; Pandey, Singh, *et al.,* 2015). Une étude plus récente a montré que la GST chi de *Synechocystis PCC 6803* avait une haute stabilité sur une gamme de pH allant de 2 à 11 ce qui est rare pour une GST (Pandey, Singh, *et al.,* 2015).

La classe eta ou GSTH appartient à une nouvelle classe de GSTs bactériennes. Découverte pour la première fois chez *Agrobacterium tumefaciens*, la AtuGSTH1-1 possède une arginine conservée en remplacement des cystéine, sérine ou tyrosine habituellement retrouvées chez les GSTs canoniques (Skopelitou *et al.,* 2012). D'un point de vue structural, cette classe de GST est proche de la classe nu/Ure2p. La protéine AtuGSTH1-1 possède une activité de réduction des hydroperoxydes et présente une activité thiol-transférase (Skopelitou *et al.,* 2012).

Les GTTs ou GlutaThion Transférases ne sont retrouvées que chez les champignons. Ces GSTs fongiques ont été découvertes pour la première fois chez la levure (Choi *et al.,* 1998). Les protéines GTT1 et GTT2 de *Saccharomyces cerevisiae* ne partagent que 11% d'identité de séquences entre elles suggérant que ces deux protéines n'appartiennent pas à la même classe (Choi *et al.,* 1998). La protéine ScGTT1 est associée au réticulum endoplasmique alors que l'isoforme ScGTT2 est nucléaire. Les deux types de GTTs possèdent des activités de conjugaison de GSH, de réduction d'hydroperoxyde et des activités glutarédoxines (Morel *et al.,* 2009; 2013; Thuillier *et al.,* 2014). La protéine ScGTT2 possède également une activité de conjugaison du GSH sur le cadmium et interviendrait dans la détoxication des métaux lourds et des quinones (Adamis *et al.,* 2004; Morel *et al.,* 2009). De manière générale, les GTT1 et GTT2 sont impliquées dans la réponse au stress oxydant. Si les GTT2 semble présenter une glycine conservée au sein de leur site actif (Ma *et al.,* 2009), aucun résidu conservé n'a pu être clairement identifié au sein de ce même site chez les GTT1.

### 3. Certaines classes sont partagées entre les plantes et divers organismes, d'autres leur sont spécifiques

#### *a. GSTs à cysteine catalytique (Cys-GSTs)*

Une étude phylogénétique réalisée chez les organismes photosynthétiques a révélé la présence de 14 classes de GSTs (Lallement *et al.,* 2014a). Ainsi les déshydroascorbate réductases (DHAR), les facteurs d'élongation 1Bγ (EF1Bγ), les glutathionyl hydroquinone réductases (GHR), les GSTs phi (GSTF), les hémérythrines (GSTH), les GSTs Iota (GSTI), Lambda (GSTL), Théta (GSTT), Tau (GSTU), Zéta (GSTZ), les prostaglandine E synthéthases microsomales de type 2 (mPGES-2), les tétrachloro-hydroquinone déshalogénases (TCHQD), les métaxines et enfin les Ure2p sont considérées comme des GSTs sur la base de la présence des deux domaines classiques des GSTs. Les GSTIs, GSTHs, DHARs, GSTLs, GHRs, mPGES-2s et les métaxines possèdent la cystéine ancestrale conservée. EF1Bγ et Ure2p ne possèdent pas de résidu conservé clairement identifié et toutes les autres GSTs contiennent une sérine conservée à la place de la cystéine.

### (1) GSTs LAMBDA

Les GSTLs ne sont retrouvées que chez les plantes terrestres et font partie des rares GSTs monomériques (Lallement *et al.,* 2014b). Les gènes codant les GSTLs sont généralement représentés par 2 à 4 copies (évènements de duplication) par génome. Les GSTs Lambda contiennent environ 230 acides aminés et sont localisées aussi bien dans le cytosol que dans le noyau ou les chloroplastes (Dixon *et al.,* 2010; Lallement *et al.,* 2014a). Ces enzymes comme beaucoup de GSTs à cystéine présentent des activités thiol transférase et DHAR (Dixon et Edwards 2010b; Lallement *et al.,* 2014b). Outre leur activité de déglutahionylation du substrat modèle PAP-SG, les GSTLs sont capables de déglutathionyler la quercétine-glutathionylée en quercétine. Elles présentent également une affinité pour d'autres polyphénols tels que les tocophérols. Ainsi les GSTLs seraient impliquées dans la réduction des polyphénols et donc dans le métabolisme des métabolites spécialisés sans pour autant que leur rôle précis dans ce processus n'ait été identifié à ce jour (Dixon *et al.,* 2011b). L'expression de certains gènes codant des GSTLs est positivement régulée en cas de stress ou d'exposition à des xénobiotiques et ces enzymes pourraient également avoir un rôle dans la résistance aux stress biotiques et abiotiques (Dixon *et al.,* 2002b; Lan *et al.,* 2011).

### (2) DESHYDROASCORBATE REDUCTASES (DHARs)

Tout comme les GSTLs, les DHARs ne sont retrouvées que chez les plantes (terrestres et algues). A l'instar des GSTLs, les DHARs sont monomériques et codées par 2 à 3 gènes issus d'événements de duplication (Lallement *et al.,* 2014a). Les DHARs contiennent environ 220 acides aminés et sont situées aussi bien dans le cytosol que dans les mitochondries, les peroxysomes ou les chloroplastes (Jimenez *et al.,* 1997; Chew *et al.,* 2003; Reumann *et al.,* 2009; Dixon et Edwards 2010a; Lallement *et al.,* 2014a). Ces enzymes sont connues essentiellement pour leur rle dans le recyclage de l'ascorbate (cycle ascorbate-GSH) en réduisant le déshydroascorbate en ascorbate (Jimenez *et al.,* 1997; Dixon *et al.,* 2002b; Lallement *et al.,* 2016). Outre leur activité réductase, ces enzymes présentent également des activités thiol-transferase (Dixon *et al.,* 2002b). Les DHARs participent indirectement à la détoxication du peroxyde d'hydrogène au sein de la voie Foyer-Halliwell-Asada, ceci même chez les espèces qui ne contiennent pas naturellement de DHAR. En effet une étude a montré que l'expression hétérologue d'une DHAR de riz chez les cyanobactéries permettait d'atténuer les effets oxydatifs délétères chez ces dernières (Kim *et al.,* 2020). Une revue récente répertorie l'effet de la surexpression des DHARs dans la plante et donc leur implication dans la résistance aux stress biotiques et abiotiques (Ding *et al.,* 2017).

### (3) GLUTATHIONYL-HYDROQUINONE REDUCTASES (GHRs)

Les GHRs (glutathionyl-hydroquinone réductases) également appelées GST Xi sont présentes chez les plantes mais également les champignons, les bactéries et les archées. Elles sont généralement plus longues que les autres GSTs à cystéine avec en moyenne 330 acides aminés par protéine et leurs gènes sont au nombre de 2 à 4 par génome. La cystéine conservée est dans le cas des GHRs retrouvée en position 50 (Belchik et Xun 2011). Ce n'est pas la seule particularité des GHRs au sein des Cys-GSTs. D'un point de vue structural, les monomères s'associent par une hélice α9 peu retrouvée chez les GSTs (également présente chez les GSTUs) (Thom *et al.,* 2002; Lallement *et al.,* 2015). Les GHRs sont localisées dans le cytoplasme, le peroxysome, le noyau et le chloroplaste (Belchik et Xun 2011; Lallement *et al.,* 2014a).

La protéine PcpF de la bactérie *Sphingobium chlorophenolicum* a été la première GHR identifiée. Cette protéine joue un rle dans le métabolisme du pentachlorophénol (PCP). Cette molécule a été utilisée principalement comme agent de préservation du bois et est un polluant environnemental majeur en raison de sa grande toxicité (Cai et Xun 2002; Huang *et al.,* 2008). Les GHRs

catalysent la déglutathionylation des quinones glutathionylées, après que ces quinones aient été glutathionylées (spontanément ou enzymatiquement) en présence de GSH (Xun *et al.,* 2010; Belchik et Xun 2011; Lam *et al.,* 2012; Lallement *et al.,* 2015; Schwartz *et al.,* 2016). Elles présentent également des activités thiol transférase et DHAR (Meux *et al.,* 2011). Le rôle physiologique des GHRs n'a toujours pas été élucidé. Chez certaines bactéries, une classe équivalente aux GHRs a été identifiée. Il s'agit des mycothiol S-transférase de la classe Xi qui utilisent le mycothiol à la place du GSH (Si *et al.,* 2019).

**(4) GSTHEMERYTHRINE,IOTA,METAXINE,MPGES-2**

Les GSTH, les GSTI, les métaxines et les mPGES-2 sont des classes retrouvées chez les plantes mais restent à l'heure actuelle peu étudiées (Lister *et al.,* 2007; Liu *et al.,* 2013; Lallement *et al.,* 2014a).

Les GSTHs et GSTIs sont retrouvées uniquement chez les plantes non vasculaires et sont représentées par 1 à 2 isoformes de 500 acides aminés en moyenne à l'exception de *Physcomitrella patens* où 8 GSTHs ont été identifiées. Ces dernières sont des métalloprotéines connues pour être impliquées dans la fixation de dioxygène (Stenkamp 1994). Ces GSTs ont la particularité de présenter à leur extrémité C-terminale un domaine supplémentaire correspondant à un domaine hémérythrine (Liu et al., 2013).

Les GSTIs sont proches des DHARs d'un point de vue phylogénétique suggérant que les DHARs dériveraient des GSTIs (Lallement *et al.,* 2014a). Les métaxines sont présentes chez les animaux, les champignons et les plantes avec peu d'isoformes (1 à 2) (Delage *et al.,* 2011). Ces protéines transmembranaires appartiennent au système de translocation de la membrane externe mitochondriale en intervenant dans l'import de précurseurs de protéines mitochondriales et dans l'assemblage du tonneau β (Lister *et al.,* 2007). Bien qu'elles fassent partie des GSTs canoniques, il n'y a pas d'évidence qu'elles portent une activité catalytique qui requerrait qui plus est la présence de GSH. De plus le motif catalytique CPxC des métaxines de plantes n'est pas conservé chez les autres organismes (Lallement *et al.,* 2014a). Les mPGES-2 ne requièrent pas forcément de GSH pour leur catalyse ce qui les a écartées pendant longtemps de la classification des GSTs. Cependant selon des critères structuraux et biochimiques ces protéines sont bien des GSTs (Lallement *et al.,* 2014a). Elles catalysent l'isomérisation de la prostaglandine $H_2$ ($PGH_2$) en prostaglandine E ($PGE_2$) et sont localisées dans la bicouche lipidique membranaire par l'intermédiaire de leur extrémité N-terminale (Yamada et Takusagawa 2007). Ces enzymes sont retrouvées chez les mammifères, les oiseaux, les poissons et chez les plantes en 1 à 3 isoformes en général. Outre leur activité d'isomérisation, les mPGES-2 ont été étudiées pour leur faculté à fixer des hèmes au travers leur propriété ligandine (Yamada et Takusagawa 2007; Watanabe *et al.,* 2008; Takusagawa 2013). La présence de l'hème semble modifier l'activité de la mPGES-2 qui convertit alors le PGH2 en acide 12 L-hydroxy-5,8,10-heptadécatriénoïque (ou HHT) plutôt qu'en $PGE_2$ (Yamada et Takusagawa 2007).

### *b. Les plantes contiennent également des classes atypiques*

Au sein des plantes, deux classes peuvent être qualifiées de singulières du fait de l'incertitude environnant leur résidu conservé. Ainsi les classes Ure2p et EF1Bγ, partagées entre les plantes et plusieurs organismes, sont insolites.

La classe des GST Nu (GSTN) également appelées Ure2p est présente chez les plantes, les champignons, les nématodes et les bactéries. Un doute subsiste sur la nature exacte du résidu conservé (tyrosine ou asparagine) des GSTN/Ure2p. Chez les plantes la tyrosine serait remplacée par une asparagine ou un aspartate, le motif APNG étant retrouvé à la position habituelle du motif catalytique (Lallement, *et al.,* 2014a). L'appellation GSTN semblerait être majoritairement utilisée pour les bactéries et les parasites alors que celle Ure2p serait utilisée pour les plantes et les champignons. Le terme Ure2p provient d'une étude sur l'Ure2 de levure possédant un domaine GST. Ure2p correspond à la forme prion de cette Ure2 (Wickner 1994). Les GSTN au sens large catalysent des réactions de conjugaison

du GSH et de réduction d'hydroperoxydes (Perally *et al.,* 2008; Zhan *et al.,* 2010; Stourman *et al.,* 2011; Roret *et al.,* 2015). Certaines Ure2p de *Phanerochaete chrysosporium* possèdent également une activité DHA réductase et de déglutathionylation (Roret *et al.,* 2015), activités normalement retrouvées chez les Cys-GSTs. Cette particularité vient du fait que ces protéines possèdent deux sites de fixation du GSH. L'un d'eux contient une molécule de glutathion oxydé stabilisé par une asparagine qui serait impliquée directement dans la catalyse (Thuillier *et al.,* 2013). Une GST Nu bactérienne aurait une activité β-éthérase du même type que celle de la LigG (une GSTFuA bactérienne) et interviendrait ainsi dans de la dégradation de la lignine (Kontur *et al.,* 2018). Chez les parasites les GSTN sont décrites pour lier des hèmes et seraient impliquées dans le métabolisme de ces derniers (Perally *et al.,* 2008; Zhan *et al.,* 2010). Chez *Aspergillus fumigatus*, une Ure2p est impliquée dans le métabolisme de la mycotoxine gliotoxine (Davis *et al.,* 2011).

Le facteur d'élongation eucaryote 1Bγ (EF1Bγ) a été beaucoup étudié pour son rôle dans la traduction chez les eucaryotes. EF1Bγ est retrouvé chez les animaux, les plantes, les champignons et les bactéries. Cette protéine nucléaire possède un domaine GST en position N-terminale et un domaine eEF1G en C-terminal (Koonin *et al.,* 1994). Je ne m'attarderai ici, que sur la partie GST N-terminale de cette protéine. La structure tridimensionnelle du domaine N-terminal de EF1Bγ de levure a été résolue. Il contient 219 acides aminés et a une architecture similaire à celle d'une GST canonique (Jeppesen *et al.,* 2003). Le domaine GST confère à EF1Bγ une activité de conjugaison du GSH (Carberry *et al.,* 2006). Ce domaine interviendrait dans l'assemblage du complexe multiprotéique EF1 (Koonin *et al.,* 1994) et serait donc impliqué dans la biosynthèse de protéines (Sheu et Traugh 1997; Achilonu *et al.,* 2014).

### *c. Ser-GST de plantes*

Bien que les GSTs à sérine de plantes ne soient représentées que par 5 classes en comparaison des 7 classes de Cys-GSTs, celles-ci représentent la grande majorité des GSTs chez les plantes. Ceci est principalement dû aux classes tau et phi qui représentent à elles seules plus de 75% des GSTs de plantes. Afin de compléter la revue qui avait été réalisée au laboratoire sur les GSTs à cystéine de plantes (Lallement *et al.,* 2014a), j'ai participé à la rédaction d'une revue portant sur les GSTs à serine chez les organismes photosynthétiques. Dans cette revue, j'ai réalisé une étude phylogénétique des Ser-GSTs identifées chez une quarantaine d'organismes photosynthétiques. Cette revue fait également un état des lieux des connaissances actuelles au niveau biochimique, structural et fonctionnel en abordant notamment leurs rôles dans la détoxication cellulaire et la tolérance aux stress.

**Article 1 : Functional, structural and biochemical features of plant serinyl-glutathione transferases**

Elodie Sylvestre-Gonon, Simon R. Law, Mathieu Schwartz, Kevin Robe, Olivier Keech, Claude Didierjean, Christian Dubos, Nicolas Rouhier et Arnaud Hecker

Frontiers in Plant Science, 2019, volume 10, article 608 ; doi: 10.3389/fpls.2019.00608

frontiers in Plant Science

REVIEW
published: 22 May 2019
doi: 10.3389/fpls.2019.00608

# Functional, Structural and Biochemical Features of Plant Serinyl-Glutathione Transferases

*Elodie Sylvestre-Gonon[1], Simon R. Law[2], Mathieu Schwartz[3], Kevin Robe[4], Olivier Keech[2], Claude Didierjean[3], Christian Dubos[4], Nicolas Rouhier[1]* and Arnaud Hecker[1]**

[1] Interactions Arbres-Microorganismes, Institut National de la Recherche Agronomique, Université de Lorraine, Nancy, France, [2] Department of Plant Physiology, Umeå Plant Science Centre, Umeå University, Umeå, Sweden, [3] Centre National de la Recherche Scientifique, Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations, Université de Lorraine, Nancy, France, [4] Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (BPMP), INRA, CNRS, SupAgro-M, Université de Montpellier, Montpellier, France

Glutathione transferases (GSTs) belong to a ubiquitous multigenic family of enzymes involved in diverse biological processes including xenobiotic detoxification and secondary metabolism. A canonical GST is formed by two domains, the N-terminal one adopting a thioredoxin (TRX) fold and the C-terminal one an all-helical structure. The most recent genomic and phylogenetic analysis based on this domain organization allowed the classification of the GST family into 14 classes in terrestrial plants. These GSTs are further distinguished based on the presence of the ancestral cysteine (Cys-GSTs) present in TRX family proteins or on its substitution by a serine (Ser-GSTs). Cys-GSTs catalyze the reduction of dehydroascorbate and deglutathionylation reactions whereas Ser-GSTs catalyze glutathione conjugation reactions and eventually have peroxidase activity, both activities being important for stress tolerance or herbicide detoxification. Through non-catalytic, so-called ligandin properties, numerous plant GSTs also participate in the binding and transport of small heterocyclic ligands such as flavonoids including anthocyanins, and polyphenols. So far, this function has likely been underestimated compared to the other documented roles of GSTs. In this review, we compiled data concerning the known enzymatic and structural properties as well as the biochemical and physiological functions associated to plant GSTs having a conserved serine in their active site.

**Keywords: photosynthetic organisms, phylogeny, structure, glutathione transferases, ligandin property, secondary metabolism, xenobiotic detoxification**

OPEN ACCESS

***Edited by:***
*Els Jm Van Damme,*
*Ghent University, Belgium*

***Reviewed by:***
*Yonghai Luo,*
*Fujian Agriculture and Forestry University, China*
*Hsu-Liang Hsieh,*
*National Taiwan University, Taiwan*

****Correspondence:***
*Nicolas Rouhier*
*nicolas.rouhier@univ-lorraine.fr*
*Arnaud Hecker*
*arnaud.hecker@univ-lorraine.fr*

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

***Received:*** *04 February 2019*
***Accepted:*** *25 April 2019*
***Published:*** *22 May 2019*

***Citation:***
*Sylvestre-Gonon E, Law SR, Schwartz M, Robe K, Keech O, Didierjean C, Dubos C, Rouhier N and Hecker A (2019) Functional, Structural and Biochemical Features of Plant Serinyl-Glutathione Transferases. Front. Plant Sci. 10:608. doi: 10.3389/fpls.2019.00608*

## INTRODUCTION

Glutathione transferases (GSTs), formerly glutathione S-transferases, constitute a ubiquitous multigenic superfamily of enzymes that conjugate the tripeptide glutathione ( -Glu-Cys-Gly) on a broad range of molecules. They catalyze the nucleophilic attack of reduced glutathione (GSH) on the electrophilic centers of these molecules. The omnipresence of these enzymes in all types of organisms highlights an ancient origin as well as fundamental functions preserved during evolution. GSTs were discovered in the early 1960s through their GSH-conjugating activity in cellular extracts from rat liver incubated with sulfobromophthalein, chloronitrobenzenes or

halogenated aromatic molecules (Booth et al., 1961; Combes and Stakelum, 1961). Later on, this conjugating activity was identified from plant extracts (sorghum and corn) using herbicides like atrazine or triazine derivatives (Frear and Swanson, 1970; Lamoureux et al., 1970). The interest for these GSH-conjugation reactions in plants was high in the 1980s, particularly concerning the enzymatic properties of cereal GSTs in connection with the detoxification of herbicides (Shah et al., 1986; Wiegand et al., 1986). Accordingly, GSTs are generally strongly induced in response to biotic and abiotic stresses, which coincides with cellular roles in primary and secondary metabolisms, in stress tolerance or cell signaling, and in xenobiotic detoxification by acting as phase II enzymes (Jakoby, 1978; Wiegand et al., 1986; Gonzalez et al., 2018). During the detoxification process, GSTs, which represent the most important classes of conjugating enzymes, conjugate phase I-activated molecules (or toxic molecules that are already activated) with GSH. Conjugation reactions are only performed by specific GST members, i.e., those having usually a conserved serine or a tyrosine (in mammals) in their active site. Those having notably a cysteine residue lack this property. The conjugation step has several benefits in the detoxification process, including a decrease of the reactivity and toxicity of the molecules, as well as an increase of their solubility. Likewise, the addition of large anionic groups such as GSH detoxifies reactive electrophiles and produces polar molecules that cannot diffuse across membranes. These molecules are then recognized and actively transported by ATP-binding cassette transporters (ABC-transporters), also known as phase III proteins (Keppler, 1999). ABC transporters carry out the ATP-dependent transport of a large variety of hydrophobic molecules and thus participate in exocytosis (animals) or sequestration in the vacuole and/or in the cell wall (plants and fungi) of phase II products (Coleman et al., 1997).

Even though most of the studies published over the past years focused on GSTs catalyzing the addition of glutathione, other catalytic activities have been described. For instance, numerous GSTs act as GSH-dependent peroxidases by reducing organic hydroperoxides (Tang and Tu, 1994; Marrs, 1996; Hurst et al., 1998) whereas others perform isomerisation reactions. The zeta GSTs catalyze the *cis-trans* isomerisation of maleylacetoacetate into fumarylacetoacetate, as part of the tyrosine degradation pathway (Thom et al., 2001; Fernandez-Canon et al., 2002). In addition to their involvement in GSH-conjugation, several GSTs also catalyze the opposite reaction, i.e., the removal of glutathione from small molecules. This reaction will be referred to as deglutathionylation. Note that this term is also used for the reduction of glutathione adducts on protein cysteine residues, as catalyzed by another family of GSH-dependent proteins called glutaredoxins (GRXs) (Rouhier et al., 2008). Although human GSTO1-1 was shown to catalyze the deglutathionylation of peptides/proteins such as glutathionylated -actin (Menon and Board, 2013), this has been rarely observed among GSTs. The capacity of catalyzing deglutathionylation reactions is linked to the existence of a catalytic cysteinyl residue instead of the active site serine or tyrosine residues. This residue is notably present in the bacterial-specific Beta GSTs (GSTBs); in Omega GSTs (GSTOs) found in mammals, insects, and fungi (Board et al., 2000; Kim et al., 2006; Yamamoto et al., 2009; Meux et al., 2013); in the plant-specific Lambda GSTs (GSTLs); and in glutathionyl-hydroquinone reductases (GHRs), also known as Xi GSTs (GSTX), which are found in bacteria, fungi, archaea, and plants (Xun et al., 2010; Meux et al., 2011; Lallement et al., 2015; Schwartz et al., 2016). However, with a few exceptions, the physiological role of these enzymes is poorly documented. In addition to being involved in deglutathionylation, as mentioned above, human GSTOs may be involved in arsenic biotransformation, reducing methyl and dimethyl arsenate forms (Zakharyan et al., 2001; Burmeister et al., 2008). Plant GSTLs may be involved in the metabolism or trafficking of flavonoids (Dixon and Edwards, 2010b). GHRs are involved in the catabolism of chlorinated quinones and in lignin degradation through the deglutathionylation of metabolic intermediates (Reddy and Gold, 2001; Masai et al., 2003; Huang et al., 2008; Meux et al., 2011).

In addition to these catalytic properties, some GSTs possess the property to bind ligands also referred to as ligandin properties. It consists of the binding of small hydrophobic molecules either at the catalytic site or in a specific ligandin site (L-site) for their transport or storage. This non-catalytic property has been documented in plants for the transport/binding of hydrophobic xenobiotic molecules, of endogenous compounds such as oxylipins and flavonoids (anthocyanins, proanthocyanidins) as well as of phytohormones such as auxin and cytokinin (Zettl et al., 1994; Gonneau et al., 1998), suggesting a possible role of GSTs in cell signaling and/or in plant growth and development (Smith et al., 2003; Kitamura et al., 2004; Gong et al., 2005; Moons, 2005; Ahmad et al., 2017).

Overall, although the biochemical (catalytic and ligandin) properties of representative members from almost all GST classes have been studied, sometimes extensively, the physiological role of most of them remains to be identified, essentially because the existence of several close isoforms in given classes may have hampered their characterization by reverse-genetic approaches. Therefore, having focused recently on the biochemical and structural properties of Cys-GSTs (Lallement et al., 2014), the objective of this review is to inventory the known properties and functions of Ser-GSTs in photosynthetic organisms.

## History and Classification of the GSTs

Over the past years, the GST classification has constantly evolved concomitantly to the increase of the genomic resources available, and to the identification and characterization of new isoforms and classes. First discovered in rat, GSTs were characterized initially in mammals and subsequently in insects, plants, fungi, and bacteria. In mammals, GSTs were originally classified as cytosolic, mitochondrial and membrane-associated GSTs, the latter being subdivided into microsomal GSTs and leukotriene $C_4$ synthetases (Kraus, 1980; Hayes and Pulford, 1995). The same three subfamilies were renamed later as soluble GSTs, kappa GSTs and membrane-associated proteins in eicosanoids and glutathione metabolism (MAPEG), respectively (Jakobsson et al., 1999). However, on the basis of their immunological cross-reactivity and sequence relatedness, mammalian GSTs were also classified into the alpha, mu, pi, sigma, theta, and

zeta classes (Mannervik et al., 1985; Dixon et al., 1998; Hayes and McLellan, 1999). At the time, most non-mammalian GSTs were placed in the heterogeneous theta class (Buetler and Eaton, 1992). For plant GSTs, the first classification introduced was based on sequence analogy and on the intron-exon structure of the genes. Subsequently, three and then four distinct types of plant GSTs were recognized including type I (GSTs with herbicide-detoxifying activity), type II (GSTs close to the mammalian zeta GSTs), type III (consisted mainly of auxin-induced GSTs), and type IV (GSTs similar to classical mammalian theta enzymes) isoforms (Droog et al., 1995; Droog, 1997). In fact, with the accumulation of biochemically characterized plant GSTs in the late 1990s, it appeared that some plant GSTs clearly grouped with specific mammalian GSTs, whereas others seemed plant-specific. Together with the release of the genome of *Arabidopsis thaliana*, this contributed to the establishment of a refined phylogenetic classification in plants using the principle of Greek-letter designations, which was widely used for non-plant GSTs (Dixon et al., 1998). GSTs are designated by using a 2 letter-code corresponding to the species (At for *A. thaliana*) followed by the 3 letters "GST," a Greek or Latin letter designating the class, and a number distinguishing members of the same class. Thus, in *A. thaliana*, isoform 1 of the Phi (F) class is designated by "AtGSTF1". This classification introduced in plants the Phi (replacing former Type I), Zeta (replacing former Type II), Tau (replacing former Type III), and Theta (replacing former Type IV) classes as well as two groups more distantly related to other known plant GSTs forming the Lambda (L) and dehydroascorbate reductase (DHAR) classes (Dixon et al., 2002). The last phylogenetic study performed a few years ago using well-annotated genomes of terrestrial plants (*A. thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens*, *Pinus tabulaeformis*, *Populus trichocarpa*, and *Solanum lycopersicum*) and selecting only proteins possessing the two regular N- and C-terminal domains (see below), led to the identification of 14 GST classes: phi (F), tau (U), theta (T), zeta (Z), lambda (L), hemerythrin (H), iota (I), ure2p, glutathionyl-hydroquinone reductase (GHR), elongation factor 1B gamma (EF1B ), DHAR, tetrachlorohydroquinone dehalogenase (TCHQD), metaxin, and microsomal prostaglandin E synthase type-2 (mPGES-2) (Lallement et al., 2014). Some of these classes are found among different kingdoms, such as Zeta or Theta classes whereas Lambda, Tau and DHAR classes are specific to plants. The Phi class is sometimes presented in the literature as specific to the plant kingdom but similar sequences have been identified in some fungi, bacteria, and protists (Morel et al., 2013; Munyampundu et al., 2016). Although it has some limitations, the primary sequence remains to date the most convenient criterion for classifying these proteins.

The evolutionary history of GSTs seems relatively complex and several scenarios have been proposed. Because Theta class GSTs were present in bacteria, the first model of evolution, dating from the early 1990s, proposed that canonical (soluble) GSTs of plants, animals, and fungi have evolved from this ancestral gene as a result of duplications followed by divergent evolution (Pemble and Taylor, 1992). In subsequent years, this model was discarded by taking into account the biochemical properties including the nature of the catalytic residue, but also the oligomeric state of the proteins, and their tridimensional structure when solved (Frova, 2006; Mashiyama et al., 2014). The structural data notably showed that the N-terminal domain of soluble GSTs adopted a TRX fold, suggesting that the evolutionary history of soluble GSTs is linked to one of the TRX superfamily members. In this model, soluble GSTs were proposed to have evolved from a TRX/GRX ancestor to which a C-terminal helical domain has been added. Subsequent major transitions are the result of the dimerization of some GSTs, the replacement of the ancestral catalytic cysteine by a serine, and finally the change of this residue by a tyrosine in many mammalian GST classes. Although these major steps likely remain true, the current model is still incomplete, as it does not include the most recently identified classes such as mPGES2, GHR, Metaxin, Hemerythrin, Iota, and Ure2p, just to cite classes present in plants.

## Gene Organization and Distribution of Ser-GSTs in Eukaryote Photosynthetic Organisms

Among the 14 classes previously identified in terrestrial plants (Lallement et al., 2014), only five classes (Tau, Phi, Zeta, Theta, and TCHQD) clearly contain members possessing a conserved serine in their active site, even though this serine is absent in some isoforms. The DHAR, Hemerythrin, Iota, Lambda, GHR, mPGES2, and metaxin classes belong to the Cys-GSTs, as they primarily contain members possessing a conserved cysteine in their active site. For the EF1B and Ure2p classes, the nature of the residue promoting GSH activation remains uncertain. Although this classification is based on the primary sequences, the recent release of several plant genomes allowed for its correlation with the intron-exon structure of GST-encoding genes as analyzed in *P. trichocarpa* (Lan et al., 2009), *P. patens* (Liu et al., 2013), *Capsella rubella* (He et al., 2016), *S. lycopersicum* (Islam et al., 2017), *Ipomoea batatas* (Ding et al., 2017), and *Brassica rapa* (Khan et al., 2018). Indeed, the number of exons is generally conserved for genes belonging to the same class, e.g., 1 or 2 for genes encoding GSTUs, 3 for GSTFs, 9 or 10 for GSTZs, 7 for GSTTs, and 2 for TCHQDs.

Hence, combining the gene structure analysis with protein motifs specific to GST classes, sequence alignments and phylogenetic trees provide a robust view of the Ser-GST gene copy number present in a given organism. A comparative genomic analysis was carried out using 39 sequenced photosynthetic organisms available in Phytozome database [version 12 (Goodstein et al., 2012)] including 3 chlorophytes, 1 bryophyte, 1 lycophyte, and 34 angiosperms; clearly extending previous genomic surveys (**Table 1**; Ding et al., 2017; Monticolo et al., 2017; Plomion et al., 2018). 1859 sequences were retrieved by BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) using *A. thaliana* GST sequences as queries and standard parameters. It is worth noting that chlorophytes but not terrestrial plants contain Tyr-GST isoforms (respectively, 6, 4, and 7 in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Micromonas pusilla*, and *Volvox carteri*) also shared by animals. The presence of such isoforms likely compensates the absence or low number of

**TABLE 1 |** Ser-GST gene content in sequenced chlorophytes and embryophytes.

| | GSTU | GSTF | GSTT | GSTZ | TCHQD |
|---|---|---|---|---|---|
| **Chlorophyte** | | | | | |
| *Chlamydomonas reinhardtii* v5.5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| *Volvox carteri* v2.1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| *Micromonas pusilla* CCMP1545 v3.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Embryophyte** | | | | | |
| *Physcomitrella patens* v3.3 | 0 | 9 | 2 | 1 | 5 |
| **Tracheophyte** | | | | | |
| *Selaginella moellendorffii* v1.0 | 38 | 1 | 3 | 2 | 1 |
| **Angiosperm** | | | | | |
| *Amborella trichopoda* v1.0 | 22 | 4 | 1 | 2 | 1 |
| **Grass** | | | | | |
| *Brachypodium distachyon* v3.1 | 40 | 21 | 1 | 3 | 1 |
| *Oryza sativa* v7_JGI | 45 | 16 | 1 | 4 | 1 |
| **Panicoideae** | | | | | |
| *Setaria italica* v2.2 | 48 | 16 | 1 | 5 | 1 |
| *Sorghum bicolor* v3.1.1 | 53 | 17 | 2 | 4 | 1 |
| *Zea mays* Ensembl-18 | 34 | 10 | 2 | 2 | 1 |
| **Eudicot** | | | | | |
| *Aquilegia coerulea* v3.1 | 24 | 29 | 3 | 2 | 1 |
| **Pentapetalae** | | | | | |
| **Asterid** | | | | | |
| *Mimulus guttatus* v2.0 | 17 | 5 | 2 | 0 | 1 |
| *Solanum lycopersicum* iTAG2.4 | 45 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| *Solanum tuberosum* v4.03 | 50 | 4 | 1 | 2 | 1 |
| **Rosid** | | | | | |
| *Eucalyptus grandis* v2.0 | 62 | 19 | 1 | 2 | 7 |
| *Vitis vinifera* Genoscope.12X | 36 | 8 | 1 | 3 | 1 |
| *Quercus robur* | 62 | 12 | 1 | 2 | 1 |
| **Poplar-Malvidae** | | | | | |
| **Malpighiales** | | | | | |
| *Linum usitatissimum* v1.0 | 30 | 11 | 4 | 3 | 2 |
| *Manihot esculenta* v6.1 | 44 | 8 | 4 | 2 | 1 |
| *Populus trichocarpa* v3.0 | 54 | 8 | 2 | 2 | 1 |
| *Ricinus communis* v0.1 | 31 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| **SBM** | | | | | |
| **Citrus** | | | | | |
| *Citrus sinensis* v1.1 | 25 | 6 | 1 | 2 | 1 |
| *Citrus clementina* v1.0 | 42 | 8 | 2 | 3 | 1 |
| **Brassicales-Malvales** | | | | | |
| *Theobroma cacao* v1.1 | 36 | 9 | 1 | 2 | 1 |
| **Brassicaceae** | | | | | |
| *Arabidopsis lyrata* v2.1 | 29 | 13 | 1 | 2 | 1 |
| *Arabidopsis thaliana* TAIR10 | 28 | 13 | 3 | 2 | 1 |
| *Boechera stricta* v1.2 | 27 | 12 | 1 | 1 | 1 |
| *Brassica rapa* FPsc v1.3 | 38 | 20 | 2 | 2 | 1 |
| *Capsella grandiflora* v1.1 | 21 | 10 | 1 | 2 | 1 |
| *Capsella rubella* v1.0 | 26 | 12 | 1 | 1 | 1 |
| *Eutrema salsugineum* v1.0 | 24 | 11 | 1 | 2 | 1 |
| **Fabidae** | | | | | |
| **Nitrogen-fixing** | | | | | |
| *Cucumis sativus* v1.0 | 24 | 3 | 1 | 2 | 1 |
| *Fragaria vesca* v1.1 | 28 | 5 | 1 | 2 | 1 |
| *Glycine max* Wm82.a2.v1 | 50 | 10 | 3 | 3 | 2 |
| *Malus domestica* v1.0 | 34 | 10 | 1 | 4 | 1 |
| *Medicago truncatula* Mt4.0v1 | 47 | 10 | 2 | 2 | 1 |
| *Phaseolus vulgaris* v2.1 | 24 | 12 | 2 | 2 | 2 |
| *Prunus persica* v2.1 | 47 | 9 | 1 | 2 | 1 |

*Sequences have been retrieved from Phytozome v12.1, a Joint Genome Institute database. Unusually high/divergent gene copy number or absence of a given gene for a few specific organisms must be regarded with cautious as this may originate from bad genome assemblies or annotation problems or from remaining pseudogenes or gene alleles.*

Ser-GSTs in these organisms (1 isoform for both *C. reinhardtii* and *V. carteri,* 0 for *M. pusilla*). In the following paragraphs, we emphasize the major features of the different Ser-GST classes, i.e., gene content and protein sequence characteristics.

## GSTs Theta (GSTTs)

In addition to plants, GSTTs are also found in animals, insects, fungi, and bacteria; suggesting that this class appeared early during evolution (Coggan et al., 2002; Bryant et al., 2006; Skopelitou et al., 2012; Han et al., 2016; Shao et al., 2017). In photosynthetic organisms, the number of GSTT genes ranges from 1 to 4 (**Table 1**). According to its early appearance, this is the only Ser-GST class present in the chlorophytes (green algae) analyzed. Its absence in *M. pusilla* might be due to a gene loss event during evolution, unless there are annotation problems. In organisms having 2 or more *GSTT* genes, the genes are often organized in cluster such as in *A. thaliana* (Dixon et al., 2002), *Linum usitatissimum*, *Manihot esculenta* or *Ricinus communis* suggesting that tandem duplication(s) occurred during evolution from an ancestral gene. Whether the resulting proteins have diverged in function remains to be explored. The GSTT proteins are generally about 250 amino acids long. The conserved serine is found around position 10 in a conserved SQPS active site signature, which (with a few exceptions) is conserved among mammals (SQPC) and insects (S[Q/A]PC). At the subcellular level, these proteins have a peroxisomal localization, which is consistent with the presence of C-terminal SK[I/M] targeting motif (Dixon et al., 2009). Peroxisomes are multifunctional organelles involved notably in the -oxidation of fatty acids in plants, a catabolic pathway contributing in particular to

the production of acetyl-CoA, NADH, and $FADH_2$, but also many lipid peroxides from polyunsaturated fatty acids that are the likely physiological substrates of GSTTs. *In vitro*, these enzymes exhibit a weak GSH-conjugation activity against conventional model substrates but they have a high GSH-dependent peroxidase activity toward linoleic acid peroxides (Dixon and Edwards, 2009).

### GSTs Zeta (GSTZs)

In addition to plants, GSTZs are also present in bacteria, fungi, and animals, even though this is often as a reduced number of isoforms. A possible reason is their specific involvement in a general process, the tyrosine catabolism (Edwards et al., 2011). In photosynthetic organisms used for the present analysis (**Table 1**), the number of GSTZ genes ranges from 1 to 5 but we could not find them in chlorophytes. They are often found as tandem duplicates in genomes such as in *A. thaliana*, *C. rubella*, or *O. sativa*.

At the protein level, GSTZs are about 225 amino acids long. The serine is located around position 20 and is included in a conserved SSC(S/A) active site signature, the first serine being the residue necessary for the GSH-conjugation reaction. The catalytic mechanism of GSTZs differs from other GSTs in that GSH is initially conjugated to the *cis* double bond of maleylacetoacetate allowing the isomerisation reaction, before being eliminated in a second step allowing the formation of fumarylacetoacetate (Thom et al., 2001). Thus, it is assumed that the conserved cysteine performs the deglutathionylation of the intermediate product at the manner of Cys-GSTs or as proposed also for TCHQDs (see below). However, bacterial GSTZs lacking this cysteine catalyze the same reaction.

### Tetrachlorohydroquinone Dehalogenases (TCHQDs)

TCHQDs have been identified in animals, fungi and plants. Plant genomes usually contain a single gene but 2, 5, and 7 TCHQD-encoding genes were identified in *Glycine max*, *P. patens*, and *Eucalyptus grandis*, respectively (**Table 1**). At the protein level, TCHQDs are on average 265 amino acids long. These proteins were first discovered in the soil bacterium *Sphingobium chlorophenolicum*, that is able to use pentachlorophenol, a fungicide used in wood preservation, as a carbon source. During the enzymatic degradation of pentachlorophenol, this bacterial TCHQD (PcpC) catalyzes the reductive dehalogenation of tetrachlorohydroquinone to trichlorohydroquinone and then to dichlorohydroquinone (Xun et al., 1992). PcpC possesses a peculiar SCIS signature containing both a serine and a cysteine. Accordingly, it reduces chloroquinones in two steps. The first step requires the serine in the GSH-conjugation of the quinone causing the departure of a chloride ion. The second step is the removal of the glutathione moiety from the quinone, a reaction performed by a nucleophilic attack of the cysteine (Willett and Copley, 1996; Kiefer and Copley, 2002). In plant proteins, there is no cysteine in the signature (often SLDS) (Lallement et al., 2014). They should therefore not be able to carry out deglutathionylation steps and may have different substrates or reaction mechanisms. Another possibility is that other GST isoforms such as GHRs substitute to TCHQDs as they are able to catalyze quinone deglutathionylation (Lallement et al., 2015).

### GSTs Phi (GSTFs)

The *GSTF* genes are found in all terrestrial non-vascular or vascular plants that have been analyzed, but are absent in green algae/chlorophytes, suggesting important functions for terrestrial life. The gene content is very variable between species as it ranges from 1 in *Selaginella moellendorffii* to 29 in *Aquilegia coerulea* (**Table 1**). In almost all genomes, a large part of these genes is organized as clusters indicating repetitive, species-specific duplications.

At the protein level, GSTFs are about 215 amino acids long and the serine is located around position 12. Given the higher number of isoforms compared to the above-described classes, the four residue signature (reminiscent of the TRX/GRX family) is more variable. Most isoforms have the conserved serine but a few, exemplified by PtGSTF8 (AVCP), AtGSTF11 (AANP), or AtGSTF12/TT19 (AACP) are lacking it. In fact, the presence of the serine is not mandatory for the GSH-conjugation reaction as shown *in vitro* using poplar GSTFs (Pégeot et al., 2017). Several subgroups have been distinguished previously, according notably to this signature but also depending on the presence of N- or C-terminal extensions (Pégeot et al., 2014). Also, it was observed that some isoforms containing a cysteine exhibit a more diversified activity profile, as they possess deglutathionylation activity in addition to the peroxidase and GSH-conjugation activities (Pégeot et al., 2017).

### GSTs Tau (GSTUs)

In light of current genomic resources, GSTUs form a plant specific class as is also the case for DHARs and GSTLs; two Cys-GST classes. Except in rare instances, such as in *Triticum aestivum* and *A. coerulea*, which contains respectively 38 and 29 GSTFs vs 26 and 24 GSTUs (Gallé et al., 2009), the GSTU class represents the largest GST class. From the absence of GSTU in green algae and in the mosses *P. patens* and *Sphagnum fallax*, the presence of only 2 GSTUs in another moss: *Marchantia polymorpha*, but the presence of 38 GSTUs in the bryophyte *S. moellendorffii*, we conclude that these genes have rapidly and dramatically expanded between bryophytes and lycophytes. They became predominant in vascular plants, being supposedly required for novel functions associated to the lifestyle of these plants. In angiosperms, the GSTU gene content is variable and range from 21 (*C. grandiflora*) to 62 (*Quercus robur* and *E. grandis*) (**Table 1**). The phylogenetic analysis of this family indicates that large clades are formed by proteins from the same species pointing to the fact that species-specific expansions occurred (Plomion et al., 2018). They normally correspond to genomic clusters produced by several successive tandem duplication events as exemplified in poplar, *A. thaliana* or *O. sativa* (Wagner et al., 2002; Soranzo et al., 2004; Lan et al., 2009). Accordingly, it is difficult to define strict orthologs for a given isoform among the different species and to determine what is the set of GSTU ancestors shared by angiosperms.

Overall, the GSTU and GSTF classes represent around 75% of all GST genes as in *Q. robur* (62 out of 88 genes)

(Plomion et al., 2018) or *A. thaliana* (41 out of 55 genes) (Dixon and Edwards, 2010a). For both classes, the expansion, specific genomic organization and high sequence similarity among duplicated members have important implications. One consequence may be the existence of functional redundancy between isoforms making it difficult to study the biological functions of a particular gene using reverse-genetic approaches. However, another consequence may be that upon duplication, some of the new gene copies, which have been less subject to evolutionary pressure and have accumulated mutations, have likely acquired structural and functional diversity. The truth is certainly in between and this remains to be experimentally addressed in a more exhaustive manner.

## Biochemical Properties and Catalytic Activities of Ser-GSTs

GSTs are versatile enzymes, accommodating diverse substrates/ligands in the active site or L-sites (**Table 2**), and catalyzing diverse enzymatic reactions as a function of the active site signature (Chronopoulou et al., 2017a). Besides the so-called ligandin function, Ser-GSTs catalyze GSH-conjugation reactions on numerous types of substrates, the reduction of organic hydroperoxides or substrate isomerisation whereas Cys-GSTs rather catalyze opposite reactions including the reduction of glutathione conjugates. For the latter aspect, we invite the reader to refer to the recent review describing Cys-GST properties (Lallement et al., 2014). For all the catalytic activities, the high reactivity of a cysteine residue (either from GSH or from the polypeptide) plays a central role in the biochemical properties carried out by GSTs. Noteworthy, some Ser-GSTs belonging to the GSTZ, TCHQD, or GSTF classes possess a cysteine residue in the catalytic center, which confers them dual activity profile.

### GSH-Conjugating Activity

Most Ser-GSTs catalyze the conjugation of GSH onto electrophilic compounds including aromatic, aliphatic or heterocyclic compounds (Deponte, 2013). This conjugation requires the binding of a GSH molecule in the glutathione binding site (G-site). In most cases, the presence of a specific residue, most often a cysteine, serine, or tyrosine at the vicinity of the cysteine of the bound GSH, induces a decrease in the thiol pKa (Board and Menon, 2013; Deponte, 2013). This pKa, usually around 9, is lowered to approximately 6.5 or even less, promoting the formation of a nucleophilic (reactive) thiolate group *in vivo*, which is able to perform a nucleophilic attack on a nearby electrophilic substrate. In other words, the conserved serine in the active site of Ser-GSTs does not play the role of the catalytic residue; rather, this is carried out by the thiolate group of GSH. The nucleophilic attack initiated by GSH occurs either by a substitution (e.g., on a chlorine atom) or by the reduction of an electron acceptor via a Michael's addition (Deponte, 2013). Several model substrates are used to measure GSH-conjugation activity, the most common being the 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). The detoxification of herbicides (e.g., atrazine and fluorodifen) and pesticides (e.g., alachlor and metolachlor) through GSH-conjugation has been extensively studied over the years, notably using GSTs from crops (Gronwald and Plaisance, 1998; Cummins et al., 2003; Cho et al., 2007).

### Peroxidase Activity

In the cells, hydroperoxides are reduced by several families of enzymes, in particular thiol peroxidases including the peroxiredoxin (PRX) and glutathione peroxidase-like protein (GPXL) families (Rouhier and Jacquot, 2005). Some GSTs also exhibit peroxidase activity, as they are able to reduce (hydro)peroxides into alcohols concomitant to the oxidation of GSH into GSSG. In this reaction, deprotonated GSH bound to the G-site of the enzyme induces a nucleophilic substitution of the bond between the two oxygen atoms of the hydroperoxyl group (R-OOH), leading to the release of GSOR and an OH group that is protonated into $H_2O$. GSOR is then cleaved into GSSG and ROH by a second nucleophilic substitution by the GSH molecule according to a mechanism that is not yet fully elucidated (Deponte, 2013). The GSTs performing this reaction have catalytic efficiencies ($10^2$ to $10^4$ $M^{-1}$ $s^{-1}$) measured in steady-state conditions in the range of those of TRX- and GRX-dependent thiol peroxidases (Pégeot et al., 2017). A major difference is, however, the rate of the first step (i.e., peroxide reduction) that occurs at turnover numbers up to $10^7$ $s^{-1}$ for some thiol peroxidases. The contribution of GSTs in the reduction of cellular hydroperoxides remains poorly described but it might be important because these are almost the only GSH-dependent peroxidases, most thiol peroxidases being dependent on GRXs or TRXs, including GPXLs (Rouhier and Jacquot, 2005; Navrot et al., 2006). Also, their contribution appears to be different depending on the organisms and the subcellular compartments considered. Among Ser-GSTs, only those belonging to the Phi, Tau, and Theta classes are able to catalyze such reactions, peroxisomal GSTTs being likely specialized in the reduction of fatty acid peroxides (Dixon et al., 2009).

### Isomerase Activity

Some GSTs, in particular from the Zeta class, catalyze the GSH-dependent isomerisation of specific metabolites, such as the *cis-trans* isomerisation of maleylacetoacetate into fumarylacetoacetate occurring during the penultimate step of tyrosine catabolism in eukaryotes (Fernández-Cañón and Peñalva, 1998; Thom et al., 2001; Fernandez-Canon et al., 2002; Edwards et al., 2011). In some bacteria, GSTZs function as maleylpyruvate isomerases (Marsh et al., 2008) and catalyze the isomerisation of maleylpyruvate into fumarylpyruvate through the third committed step in the degradation of salicylate to the metabolites pyruvate and fumarate via gentisate. Contrary to other activities described above, GSH is not considered as a substrate but as a cofactor because it is not consumed during the reaction (Litwack et al., 1971; Marsh et al., 2008).

### Non-enzymatic Binding and Intracellular Transport

In addition to their catalytic function, GSTs also serve as non-enzymatic carrier proteins or ligandins (Habig et al., 1974; Mannervik and Danielson, 1988). The term "ligandin" was historically associated to proteins characterized in animals,

which were able to bind a wide range of hydrophobic ligands, such as steroids, heme and its degradation product bilirubin, carcinogens, and bile salts. These proteins turned out to be GSTs from the Alpha and Mu classes (Levi and Arias, 1969; Ketley et al., 1975). Since then, plant GSTUs and GSTFs were found to bind several tetrapyrroles, e.g., protoporphyrin IX (Proto IX), Mg-protoporphyrin but also bacterial porphyrin derivatives identified upon expression of recombinant maize GSTUs (Lederer and Böger, 2005; Dixon et al., 2008). However, it is not clear whether this is strictly a ligandin function as *Zea mays* GSTU1 is able to catalyze the conjugation of GSH on protoporphyrinogen IX and harderoporphyrinogen (Dixon et al., 2008). Another example, likely the best described, concerns anthocyanins, which are phenolic antioxidant compounds conferring the colors we commonly associate with fruits and flowers. These molecules are transiently bound/transported by GSTs before their release to ABC-type transporters for vacuolar sequestration. This is documented for both Tau and Phi class members, i.e., Bz2 (GSTU) from maize, AN9, TT19, and VvGST4 (GSTFs) from *Petunia hybrida*, *A. thaliana* and *Vitis vinifera*, respectively (Marrs, 1996; Alfenito, 1998; Mueller et al., 2000; Kitamura et al., 2004; Conn et al., 2008; Gomez et al., 2011; Momose et al., 2013; Zhao, 2015). Other molecules were isolated using ligand fishing approaches (**Table 2**). GSTU2 from *V. vinifera* binds *trans*-resveratrol, a polyphenol transported from the cells into extracellular medium and conferring antimicrobial properties (Martínez-Márquez et al., 2017). GSTF2 and GSTF3 from *A. thaliana* were described *in vitro* to bind various ligands

**TABLE 2 |** Ligands of plant Ser-GSTs identified.

| Isoform | Organism | Ligands | References |
|---|---|---|---|
| Bronze-2 or Bz2 (GSTU) | *Zea mays* | Cyanidin-3-glucoside | Marrs et al., 1995 |
| ZmGSTI-I, ZmGSTI-II, ZmGST II-II, ZmGST III-III (GSTU et GSTF) | *Zea mays* | Protoporphyrin IX, mesoporphyrin, coproporphyrin, uroporphyrin, Mg-protoporphyrin | Lederer and Böger, 2003 |
| ZmGSTU1 | *Zea mays* | Uroporphyrin, pentacarboxyl porphyrin, harderoporphyrin-SG, coproporphyrin, heme B | Dixon et al., 2008 |
| ZmGSTF1 | *Zea mays* | Gibberellic acid, indole-3-butyric acid, 2-naphtoxyacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, kinetin, quercetin, luteolin | Axarli et al., 2004 |
| AtGSTU7 | *Arabidopsis thaliana* | Protoporphyrin-SG, myristoyl-glutathione | Dixon and Edwards, 2009, 2018 |
| AtGSTU19 | *Arabidopsis thaliana* | Harderoporphyrin-SG, chlorogenic acid, 10-S-glutathionyl-12-oxo-phytodienoic acid, oxylipin-SG, 3-methylindolyl glutathionyl disulfide, 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) | Dixon and Edwards, 2009, 2018 |
| Transparent testa 19 or TT19 (GSTF) | *Arabidopsis thaliana* | Anthocyanin | Kitamura et al., 2004 |
| AtGSTF2, AtGSTF3 | *Arabidopsis thaliana* | Norharmane, harmane, lumichrome, indole-3-aldehyde, quercetin-3-O-rhamnoside | Dixon et al., 2011a |
| AtGSTF2 | *Arabidopsis thaliana* | Indole-3-aldehyde, camalexin, quercetrin, quercetin | Ahmad et al., 2017 |
| AtGSTF2 | *Arabidopsis thaliana* | Grossamide K-SG, cannabisin, 10-S-glutathionyl-12-oxo-phytodienoic acid, kaempferol-3,7,4 -trimethylether, quercetin-3,7,3 ,4 -tetramethylether | Dixon and Edwards, 2018 |
| Anthocyanin9 or An9 (GSTF) | *Petunia hybrida* | Anthocyanin | Alfenito, 1998 |
| Anthocyanin9 or An9 (GSTF) | *Petunia hybrida* | Isoquercitrin, quercetin, cyanidin, luteolin | Mueller et al., 2000 |
| GST | *Hyoscyamus muticus* | Indole-3-acetic acid | Bilang et al., 1993 |
| CkmGST3 (GSTF) | *Cyclamen persicum* *Cyclamen purpurascens* | Anthocyanin | Kitamura et al., 2012 |
| VvGST1 (GSTU), VvGST4 (GSTF) | *Vitis vinifera* | Anthocyanin | Conn et al., 2008 |
| VvGSTU2 | *Vitis vinifera* | *Trans*-resveratrol | Martínez-Márquez et al., 2017 |
| Flavonoid3 or Fl3 | *Dianthus caryophyllus* | Anthocyanin | Larsen et al., 2003 |
| PfGST1 (GSTF) | *Perilla frutescens* | Anthocyanin | Yamazaki et al., 2008 |
| AtGSTU9, AtGSTU10 | *Arabidopsis thaliana* | fatty acyl (C14,C16,C17, C18) | Dixon and Edwards, 2009 |
| AtGSTU25, AtGSTU28 | *Arabidopsis thaliana* | fatty acyl (C6,C8,C10,C12,C14) | Dixon and Edwards, 2009 |
| AtGSTF6 | *Arabidopsis thaliana* | Indole-3-acetonitrile | Su et al., 2011 |
| AtGSTU13 | *Arabidopsis thaliana* | Indole-3-ylmethyl-ITC (indole glucosinolate) | Piślewska-Bednarek et al., 2018 |

such as lumichrome, harmane, norharmane, indole-3-aldehyde, camalexin, and quercetin-3-O-rhamnoside (Dixon et al., 2011a) but the physiological significance remains unknown. In addition to a carrier function, it may be that the non-enzymatic binding of molecules prevents their oxidative damage, thus ensuring a protective effect (Mueller et al., 2000).

## Structural Characteristics of Plant Ser-GSTs

Considering the high number of Ser-GSTs in plants, only a few structures have been solved so far: 27 for GSTUs, 15 for GSTFs, 1 for GSTZ, and none for TCHQD and GSTT (**Table 3**). All these plant Ser-GSTs are homodimeric enzymes in which each protomer of approximately 23–30 kDa contains two domains with a catalytic center at the interface. The N-terminal domain adopts the typical TRX-fold (with 1 1 2 2 3 4 3 topology) and the C-terminal domain is a bundle of at least five helices ( 4 to 8) (**Figure 1**). GSTUs have an additional 9 helix that is oriented toward the active site without occluding it (Thom et al., 2002). In GSTFs, the 6- 7 connection systematically includes a small helix ( 6 ) (Reinemer et al., 1996; Pégeot et al., 2014, 2017). The atomic model of the only GSTZ crystal structure, that of *A. thaliana* GSTZ1, is incomplete between helices 4 and 5, which hinders the accurate determination of the active site (Thom et al., 2001). Within a class, the variable regions are often close to the active site and involved in the binding of the electrophilic substrate. In GSTUs, these regions include helix 9 and the segment from roughly the C-terminal end of 4 to the N-terminal end of 5 (Valenzuela-Chavira et al., 2017). In GSTFs, they include this segment and the connection 2- 3, which, in maize GSTF3, was supposed to move upon binding of the substrate in the active site (Neuefeind et al., 1997a). This connection is also involved in the dimer stabilization (see below).

Concerning dimerization, the GSTU dimer has an open V-shaped configuration with 2200 Å$^2$ of the accessible surface that is buried at the interface, comparable with that of GSTOs (2000 Å$^2$), but smaller than that of GSTFs (2700 Å$^2$) and

**TABLE 3 |** Crystal structures of Ser-GSTs from plants.

| Class | Organism | Name | Ligand | PDB Entry | References |
|---|---|---|---|---|---|
| | *Arabidopsis thaliana* | AtGSTF2 | GTX[a] (1GNW)[b], FOE[a] (1BX9)[b], 7WB[a] (5A5K)[b], QUE[a] (5A4V)[b], I3A[a] (5A4U)[b], QCT[a] (5A4W)[b] | 1GNW, 1BX9, 5A5K, 5A4V, 5A4U, 5A4W | Reinemer et al., 1996; Prade et al., 1998; Ahmad et al., 2017 |
| **Phi** | *Populus trichocarpa* | PtGSTF1 | GSH[a] (4RI6)[b], GSH[a] (4RI7)[b] | 4RI6, 4RI7[c] | Pégeot et al., 2014 |
| | | PtGSTF2 | | 5EY6 | Pégeot et al., 2017 |
| | | PtGSTF5 | GSH[a] | 5F05 | |
| | | PtGSTF7 | GSH[a] | 5F06 | |
| | | PtGSTF8 | GSH[a] | 5F07 | |
| | *Zea mays* | ZmGSTF1 | CYW[a] (1AXD)[b], ATA[a] (1BYE)[b] | 1AXD, 1BYE | Neuefeind et al., 1997a; Prade et al., 1998 |
| | | ZmGSTF3 | | 1AW9 | Neuefeind et al., 1997b |
| | *Triticum aestivum* | TaGSTU4-4 | GTX[a] | 1GWC | Thom et al., 2002 |
| | *Arabidopsis thaliana* | AtGSTU20/ FIP1 | GSH[a] | 5ECS, 5ECR, 5ECQ, 5ECP, 5ECO, 5ECN, 5ECM, 5ECL, 5ECK, 5ECI, 5ECH | Chen et al., 2017 |
| | | AtGSTU23 | GSH[a] (6EP7)[b] | 6EP6, 6EP7, 5O84 | Tossounian et al., 2018 |
| | | AtGSTU25 | GSSG | 5G5A | [d] |
| **Tau** | *Glycine max* | GmGSTU4 | GTB[a] (2VO4, 5AGY)[b], GSH[a] (4TOP)[b] | 2VO4, 4TOP, 5AGY[e] | Axarli et al., 2009a,b; Burmeister et al., 2008 |
| | | GmGSTU10-10 | GS8[a] | 4CHS | Skopelitou et al., 2015 |
| | *Mangifera indica* | MiGSTU | GSH[a] (5G5F), GTX[a] (5KEJ) | 5G5E, 5G5F, 5KEJ | Valenzuela-Chavira et al., 2017 |
| | *Oryza sativa subsp. japonica* | OsGSTU1 | GSH[a] | 1OYJ | Dixon et al., 2003 |
| | *Populus trichocarpa* | PtGSTU30 | GSH[a] | 5J4U, 5J5N[f] | Yang et al., 2019 |
| | *Ricinus communis* | EFI-501866 | | 4J2F | [d] |
| **Zeta** | *Arabidopsis thaliana* | GSTZ1 | | 1E6B | Thom et al., 2001 |

*[a]PDB ligand codes: GSH, Glutathione; GTX, S-hexylglutathione; FOE, FOE-4053-glutathione conjugate; 7WB, Camalexin; QUE, Quercetin; I3A, Indole-3-aldehyde; QCT, Quercetrin; CYW, Lactoylglutathione; ATA, Atrazine glutathione conjugate; GTB, S-(P-Nitrobenzyl)glutathione; GS8, S-Hydroxy-glutathione. [b]PDB, entry where the ligand is present. [c]4RI7: crystal structure of an isoform of PtGSTF1, which contains mutation of S13 to C. [d]crystal structures only available in the PDB. [e]5AGY: crystal structure of an isoform of GmGSTU4, which contains mutations of I183 to V, Q46 to K, R38 to Q, and W114 to C. [f]5J5N: crystal structure of an isoform of PtGSTU30, which contains mutation of R39 to W.*

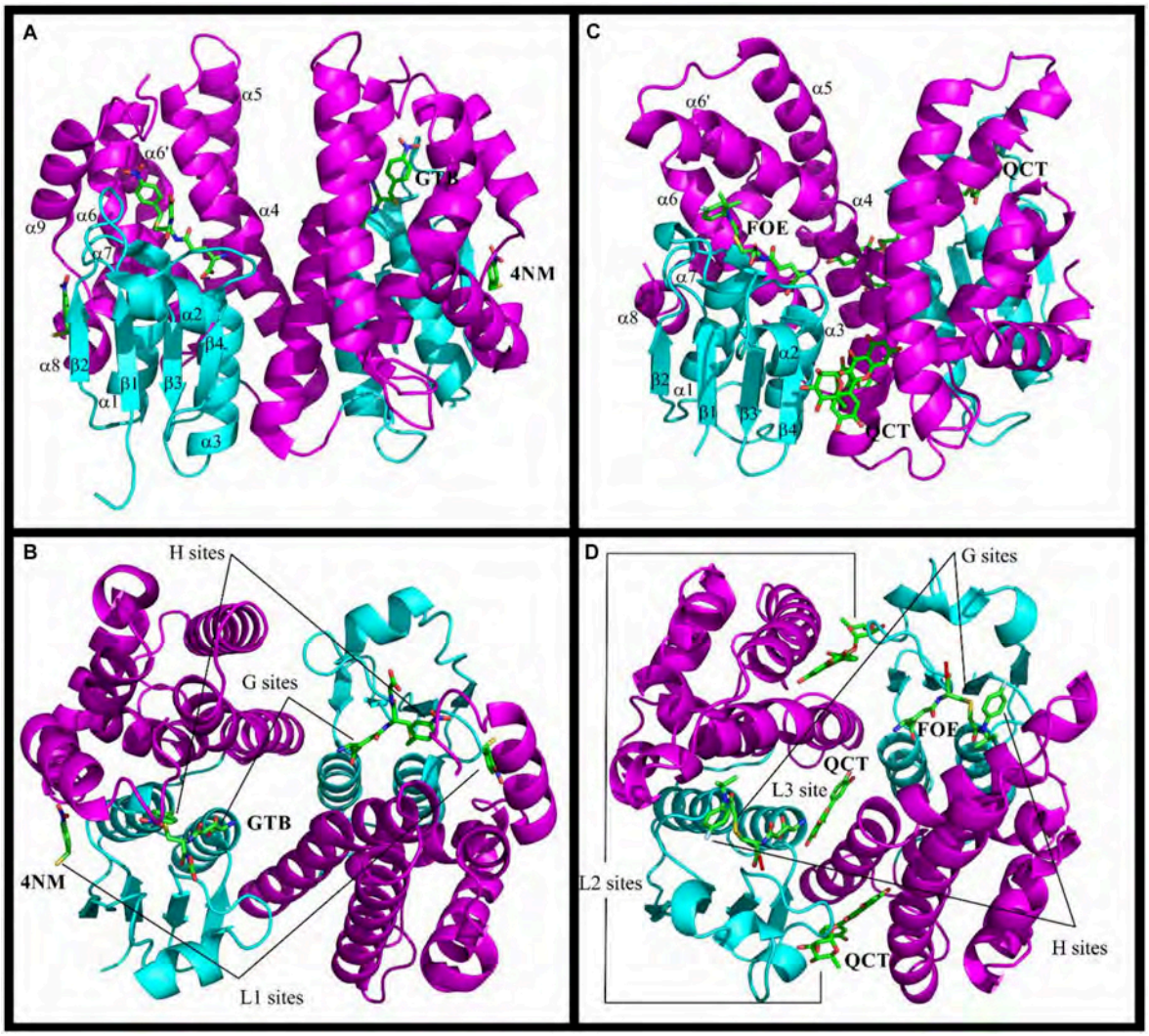



**FIGURE 1 |** Structures of Ser-GSTs from plants highlighting the location of ligand-binding sites. **(A–D)** schematic structure of the GmGSTU4 and AtGSTF2 dimers, respectively. **(C,D)** illustrate the complexes formed between AtGSTF2 and FOE (1BX9) or QCT (5A4W). The secondary structures and the location of the ligand-binding sites are labeled. The TRX domain is in cyan and the C-terminal domain is in magenta. The labeled ligands are: GTB, S-(P-Nitrobenzyl)glutathione; 4NM, 4-Nitrophenyl methanethiol; FOE, FOE-4053-glutathione conjugate; QCT, Quercetrin.

most other classes of GSTs (2800–3400 Å$^2$) (Axarli et al., 2010). The monomers are related by a two-fold symmetry where the N-terminal domain of one subunit cross-interacts with the C-terminal domain of the second one, and vice versa. The contact regions are the loop 2- 2, the strand 3 and the helix 3 of one monomer and the helices 4 and 5 of the other. The dimerization interface involves hydrophobic surface patches and a particular lock-and-key motif in which the side-chain of an aliphatic or aromatic residue extends across the dimer interface (Val52 in TaGSTU4 and Phe53 in PtGSTF1, **Table 3**). In GSTUs, conserved salt bridges close to the dyad axis bind both subunits. In GSTFs, the number and the nature of the polar interactions vary significantly from one isoform to another. Indeed, a single hydrogen bond connects the two subunits of AtGSTF2 (Reinemer et al., 1996) whereas nine are found in PtGSTF1 (Pégeot et al., 2014).

The GST catalytic center is usually divided in two distinct functional regions, a hydrophilic G-site for binding glutathione, and an adjacent hydrophobic H-site for accommodating electrophilic substrates. The anchoring residues of the G-site are well conserved among all GSTs probably because of their high specificity for glutathione. These residues are highlighted in the structural alignments (**Figure 2**). In Ser-GSTs, the GSH thiol group is normally hydrogen bonded to the hydroxyl group of the catalytic serine (Ser13 in PtGSTF1) (Pégeot et al., 2014). However, this serine is important but not mandatory for GSH-conjugating reactions as concluded from mutagenesis studies or its absence in some GSTFs (Pégeot et al., 2014). In poplar GSTFs, nearby hydroxylated residues present in the active site

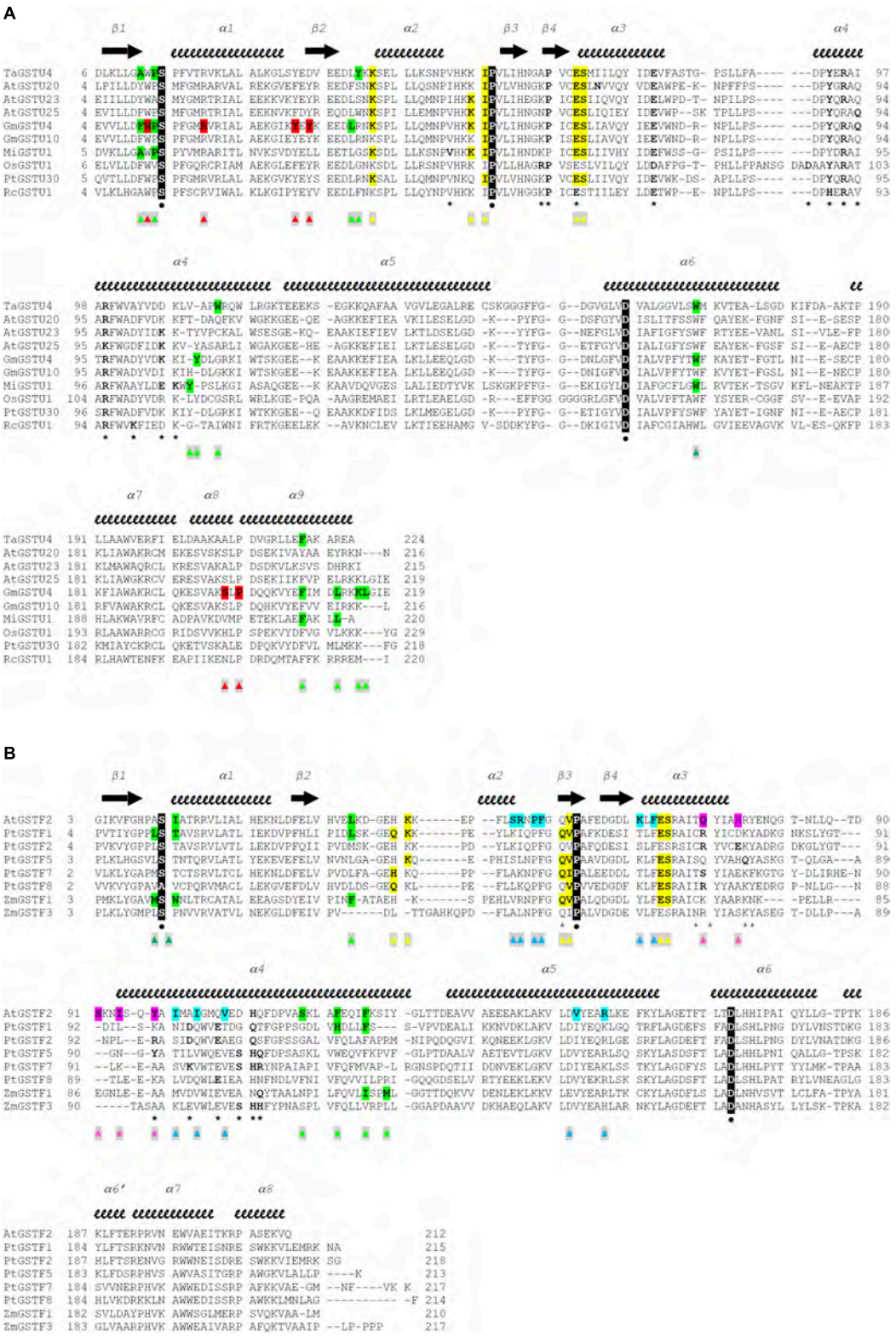



**FIGURE 2 |** Structure-based sequence alignments of Tau class **(A)** and Phi class **(B)** GSTs from plants. The sequence alignment was generated with Chimera (Pettersen et al., 2004) and manually adjusted. Crystal structures and sequences are available at the Protein Data Bank (http://www.rcsb.org): 1GWC for TaGSTU4, 5ECS for AtGSTU20, 6E6P for AtGSTU23, 5G5A for AtGSTU25, 2VO4 for GmGSTU4, 4CHS for GmGSTU10, 5G5E for MiGSTU1, 1OYJ for OsGSTU1, 5J4U for

*(Continued)*

**FIGURE 2 |** Continued
PtGSTU30, 4J2F for RcGSTU1, 1GNW for AtGSTF2, 4RI6 for PtGSTF1, 5EY6 for PtGSTF2, 5F05 for PtGSTF5, 5F06 for PtGSTF7, 5F07 for PtGSTF8, 1AXD for ZmGSTF1, and 1AW9 for ZmGSTF3. Secondary structures are labeled and shown using arrows ( -strands) and squiggles (helices). The active site serine, the invariant proline and the quasi-invariant aspartic acid are in bold type, colored white, highlighted black, and marked with . Residues that participate in dimer stabilization via strong polar interactions are in bold and marked with . Residues involved in binding glutathione (G-site) are in bold type, highlighted yellow, and marked with . Residues of the characterized H-sites are in bold type, highlighted green, and marked with . Residues of the L1-site (GmGSTU4, 2VO4) are in bold type, highlighted red, and marked with . Residues of the L2-site (AtGSTF2, 5A4U, 5A4V, and 5A4W) are in bold type, highlighted blue, and marked with . Residues of the L3-site (AtGSTF2, 5A4K, 5A4U, and 5A4W) are in bold type, highlighted pink, and marked with .

signature (often STxT) could be involved in GSH activation (Pégeot et al., 2017). Generally speaking, the H-site is built from elements from both the N- and C-terminal domains. The observed variations reflect the broad electrophilic-substrate specificities of the different GST isoforms/classes. Only AtGSTF2 and ZmGSTF1 crystal structures were obtained in the presence of herbicidal-glutathione conjugates (**Figure 1**; Prade et al., 1998). In other cases, the H-sites have been defined from the presence of inhibitors such as S-hexylglutathione or molecules from the crystallization medium. In the large majority of cases, the putative H-site residues are hydrophobic in nature. In GSTFs, the H-site involves residues located around the catalytic serine (N-terminal end of helix 1), in the loop 2- 2 and in the C-terminal end of helix 4. In GSTUs, residues from two additional regions are concerned, namely the helix 6 and the additional helix 9. A conserved tryptophan is present in the helix 6 of GSTUs (Trp171 in TaGSTU4) (Thom et al., 2002). In GSTFs, aromatic residues identified by mutagenesis studies have been clearly demonstrated as participating in the affinity toward electrophilic substrates (Axarli et al., 2004; Dixon et al., 2011a).

The structures of GSTs include other important regions that are associated with non-catalytic functions. AtGSTU20, also named FIP1 (FIN219-interacting protein 1) because it interacts with the jasmonate-amido synthetase FIN219, participates in the jasmonate signaling response under far-red light conditions (Chen et al., 2007, 2017). In a crystallographic study, it was shown that the formation of the FIP1-FIN219 complex results in the reorientation of the FIN219 C-terminal domain, which appears crucial for improving jasmonoyl-isoleucine biosynthesis. However, the overall conformation of AtGSTU20 is not altered and the FIN219-binding region includes the C-terminal 6 to 8 helices. Interestingly, the authors noted that some of the contact residues are well conserved in GSTUs and GSTs of other species (**Figure 2**; Chen et al., 2017). For their ligandin function, GSTs bind a wide range of compounds in a non-catalytic manner at so-called L-sites, which are often distinct from the active site. Three different L-sites were described in GSTs from plants (**Figure 1**). The structural analysis of GmGSTU4-4 revealed the presence of one molecule of (4-nitrophenyl)methanethiol in each subunit in a hydrophobic surface pocket (L1-site) (Axarli et al., 2016). The bottom and walls of the L1-site are lined with residues from 1, 2, and 8. The main binding residues are conserved in GSTUs. The crystal structures of AtGSTF2 in complex with two indole derivatives and two flavonoids revealed two other ligand-binding sites (L2 and L3) (Ahmad et al., 2017) extending the observation of tight protein-ligand interactions ($K_d$ 1 M) by isothermal titration calorimetry (Dixon et al., 2011a). The L2 site is situated between helices 4 and 7 in each monomer whereas the L3 site is located at the base of the dimer interface involving helices 3 of one subunit and 4 of its neighbor (**Figure 1**). All ligands are stabilized mainly through hydrophobic interactions (Ahmad et al., 2017). Coupled to biochemical evidence, the presence of these non-catalytic L-sites in GSTUs and GSTFs suggest that at least some of them should function in the transport of endogenous metabolites (Dixon et al., 2011a). However, the residues forming these L-sites are difficult to identify because they are not well-conserved among plant GSTs (Ahmad et al., 2017).

## Gene Expression of Ser-GSTs in *A. thaliana*

Analyzing the transcript abundance of these GSTs could be helpful to understand the possible redundancy between close/duplicated isoforms as well as to give clues about their functions in the absence of molecular and genetic information. In fact, it is quite well documented in many species that the expression of *GSTF* and *GSTU* genes is often induced in response to environmental constraints. This includes heavy-metal exposure (Moons, 2003; Ahsan et al., 2008; Reid et al., 2013; Tripathi et al., 2014), salinity, heat, cold, drought (Jha et al., 2011; Tiwari et al., 2016; Yang et al., 2016; Xu et al., 2018; Srivastava et al., 2019), or biotic interactions such as pathogenic interaction (Rinaldi et al., 2007; Skopelitou et al., 2015; Kao et al., 2016). The expression of several *GSTF* and *GSTU* genes is also enhanced in response to phytohormones including abscisic acid, auxin, ethylene, methyl jasmonate and salicylic acid, to herbicides and to herbicide safeners, and more generally to treatments leading to an oxidative stress (DeRidder, 2002; Wagner et al., 2002; Lieberherr et al., 2003; Smith et al., 2003, 2004; Sappl et al., 2004, 2009; Chen et al., 2012; Chronopoulou et al., 2017b). Thus, using *A. thaliana* as a representative organism, the transcript abundance of 44 out of the 47 Ser-GST genes was retrieved from the AtGenExpress datasets. The expression profiles of GSTF2 (At4g02520), GSTF7 (At1g02920), and TCHQD (At1g77290) were not available and are therefore not present in this gene expression analysis.

First, we examined the expression profiles of Ser-GST genes in the context of a developmental time-course in Arabidopsis (**Figure 3**), using the AtGenExpress Developmental Set (Schmid et al., 2005). In this case, the transcript abundance of each gene was standardized using z-score transformation (a form of normalization that is particularly useful when comparing samples from diverse treatments/tissue backgrounds), and arranged by classes. One can clearly see that most GSTFs and GSTUs, as well as the two GSTZs, have their highest expression in roots. However, for the three GSTTs, the highest expression is found in samples spanning seed development (siliques/seeds), particularly

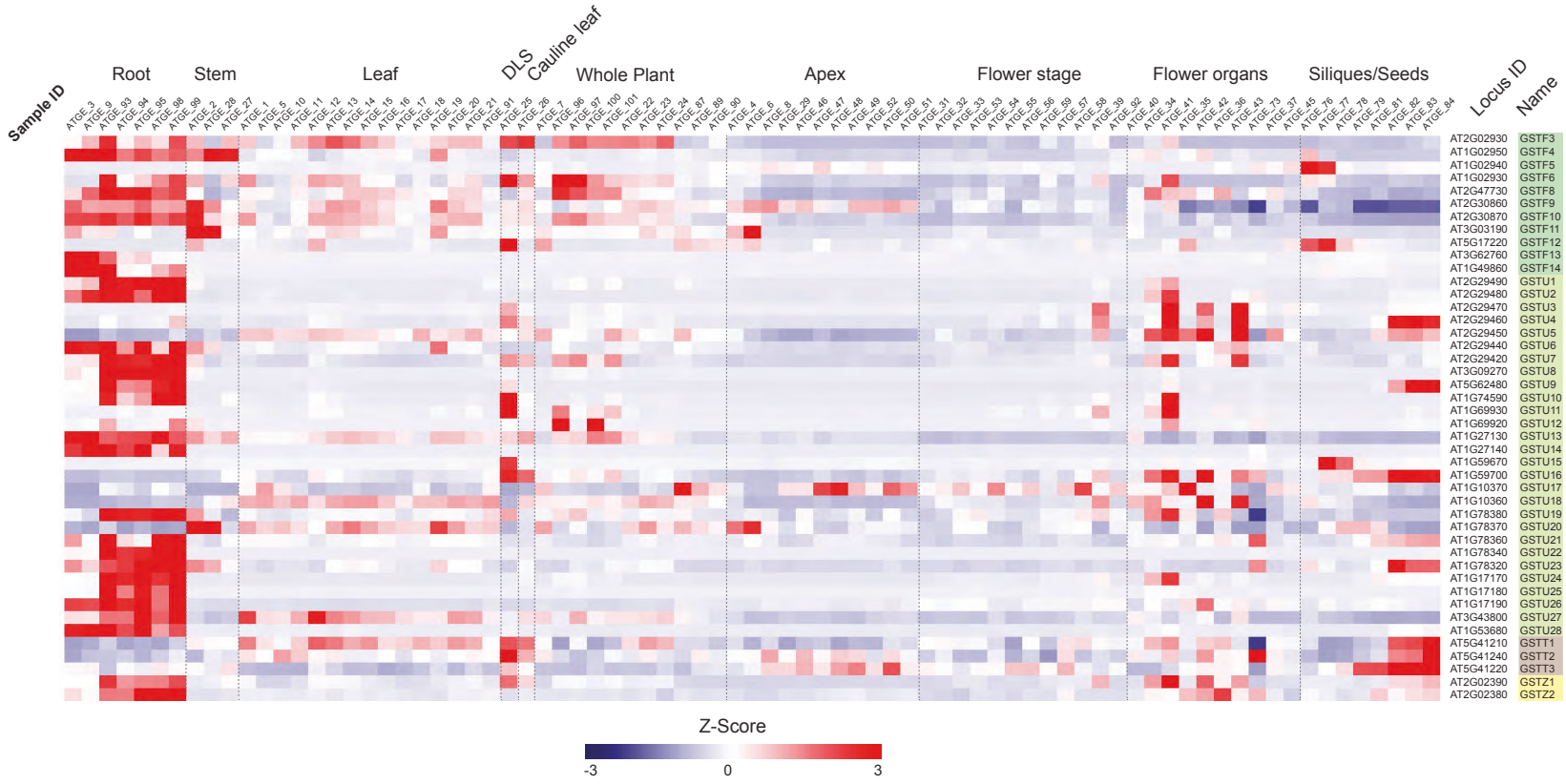



**FIGURE 3 |** Transcript abundance of 44 Ser-GST genes during Arabidopsis development. Microarray experimental data (generated using Affymetrix ATH1 GeneChip arrays) of Arabidopsis Development (AtGenExpress Developmental Expression Atlas) described by Schmid et al. (2005) were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Intensity values of replicates were averaged and z-score transformed across the following ten developmental conditions: roots, stems, rosette leaves, developmental leaf senescence (DLS), cauline leaf, whole plant, apex, flowering stages, flower organs, and siliques/seeds. The data were then imported into The Institute for Genomic Research Multiple Experiment Viewer (MVE) and hierarchically clustered using average linkage based on Euclidean distance. Gene families of each gene are indicated using the following color key: tau, light green; phi, medium green; theta, gray; and zeta, yellow.

in those containing isolated maturing seeds. In addition, these GSTTs also exhibited increased transcript abundance during developmental leaf senescence (DLS), however, this cannot be relied upon too strongly as only one time point is included in this dataset. Interestingly, within the GSTF family, *GSTF5* is only highly expressed at the two first stages of siliques/seeds (siliques bearing developing seeds), a specificity that is also found for *GSTF12*, albeit the transcript abundance also peaks during DLS. The *GSTF3*, *6*, *8*, *9*, *10*, and *11* genes are also expressed in leaves and in whole plant stages, but to a much lower level than in roots. As already said, most of the *GSTUs* display their highest expression levels in roots, however, *GSTU4*, *9*, *15*, and *16* are exclusively and strongly expressed at the siliques/seeds stages. An exception is *GSTU23*, which exhibits its highest transcript abundance in both roots and siliques/seeds stages. Finally, many Ser-GSTs appear to have transient expression during whole plant, leaf, flower, and stem development, which could suggest very specific functions in response to developmental cues.

In a second stage of analysis, we examined the expression profile of these same 44 Ser-GSTs in response to a number of abiotic stresses [AtGenExpress Stress Set; (Kilian et al., 2007)]. Data are presented as a log2 fold-change of the stress treatment (at a given time point) versus its respective control sample, and the entire dataset is hierarchically clustered using Euclidean distance (**Figure 4**). This analysis clearly demonstrates that most Ser-GSTs strongly respond to stresses applied to the roots and thus, substantiates the high expression profiles observed in roots from the developmental stage analysis (**Figure 3**). Interestingly, GSTs present in clusters 3, 4, 5, 6, and 7 exhibit high transcript abundance in response to temperature changes in roots (cold and heat). That said, the five GSTs comprising clusters 3, 4, and 5 additionally exhibit high transcript abundance in response to almost all stresses, in both aerial and subterranean tissues. Also of note here, whereas the 2 GSTs of cluster 1, (*GSTF11* and *GSTU20*) have an overall low fold-change of their transcript abundance in response to all stresses as compared to most of the other GSTs, the 6 GSTs included in cluster 2 seem to consistently respond to osmotic changes, salt and drought stresses in both root and aerial parts. Altogether, this clearly indicates that Ser-GSTs are involved in the molecular responses to several environmental cues, both biotic and abiotic, a fact that is discussed further in the next chapter.

## Physiological Roles of Ser-GSTs in *A. thaliana*

As highlighted above, Ser-GSTs constitute the largest group of GSTs in plants. Although several molecular and biochemical studies have shed light on their tridimensional structures, biochemical properties, and enzymatic activities, very little is known about the actual roles that these proteins play *in planta*. This lack of knowledge might reflect the functional redundancy that most probably exists between these GSTs (Sappl et al., 2009; Rahantaniaina et al., 2017). Nevertheless, the use of the model plant *A. thaliana* has aided in deciphering the role played by some of the 47 Ser-GSTs (13 GSTFs, 28 GSTUs, 1 TCHQD, 2 GSTZs, and 3 GSTTs) (**Table 4**; Wagner et al., 2002; Dixon and Edwards, 2010a).

GSTUs were first associated with plant xenobiotic detoxification, in particular the detoxification of herbicides. It was proposed that high GSTU activity, due to a high endogenous level of expression, was at the center of the observed differential sensitivity to herbicides between cereals (e.g., maize, wheat, and rice) and weeds (Cummins et al., 2011). In *A. thaliana*, it was proposed that *AtGSTU26*, whose expression is induced in response to chloroacetanilide herbicide treatments, could participate in the detoxification of these harmful chemicals by catalyzing their glutathionylation (Nutricati et al., 2006). The xenobiotic detoxification activity of GSTU extends to other chemicals. For instance, a recent study focusing on a major worldwide military pollutant, namely the 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), highlighted the role played by GSTUs in detoxifying this harmful and highly persistent pollutant by catalyzing its GSH-conjugation (Gunning et al., 2014). In this study, the authors showed that overexpressing *AtGSTU24* and *AtGSTU25*, two genes whose expression is induced by TNT, was sufficient to enhance the ability of *A. thaliana* plants to withstand and detoxify TNT.

In addition to their role in detoxifying xenobiotic compounds, *A. thaliana* GSTUs were associated with the response to environmental cues. One of the best examples is the response to light signals. This was first demonstrated with *GSTU20*, a gene whose expression is induced under far-red irradiation and inhibited by *phytochrome A* (*phyA*) mutation (Chen et al., 2007). The characterization of gain- and loss-of-function mutant lines suggested the key role that GSTU20 plays in regulating cell elongation and flowering time in response to light (Chen et al., 2007). Similarly, *GSTU17*, whose expression is regulated by different photoreceptors (especially phyA), participates in the modulation of several aspects of seedling development (e.g., hypocotyl elongation, root development, anthocyanin accumulation) (Jiang et al., 2010). Two other GSTUs were also associated with the *A. thaliana* response to light stress, namely *GSTU5* and *GSTU14* (Liu and Li, 2002; Lv et al., 2015).

GSTU17 also plays a role in the response to drought and salt stresses (Chen et al., 2012). The *gstu17* mutation confers a higher tolerance to drought and salt stresses when compared to wild-type plants that could be attributed to an increased accumulation of GSH and ABA within the plant tissues. In this process, GSTU17 acts as a negative component of the stress-mediated signal transduction pathways. Conversely, the overexpression of GSTU19 in *A. thaliana* plants confers tolerance to drought and salt stresses (Xu et al., 2016). The fact that the overexpression of *GSTU19* also confers an increased tolerance to methyl viologen (a pro-oxidant compound) together with increased activity of antioxidant enzymes indicates that GSTU19 may be involved in counteracting the oxidative damages associated with drought or salt stresses. Additionally, the *A. thaliana* response to drought and salt stresses, mediated by the AtRGGA RNA-binding protein, involves *GSTU9* (Ambrosone et al., 2015).

GSTUs are also involved in plant response to biotic stresses. A recent example is the observation that *gstu13* mutants display an enhanced susceptibility, when compared

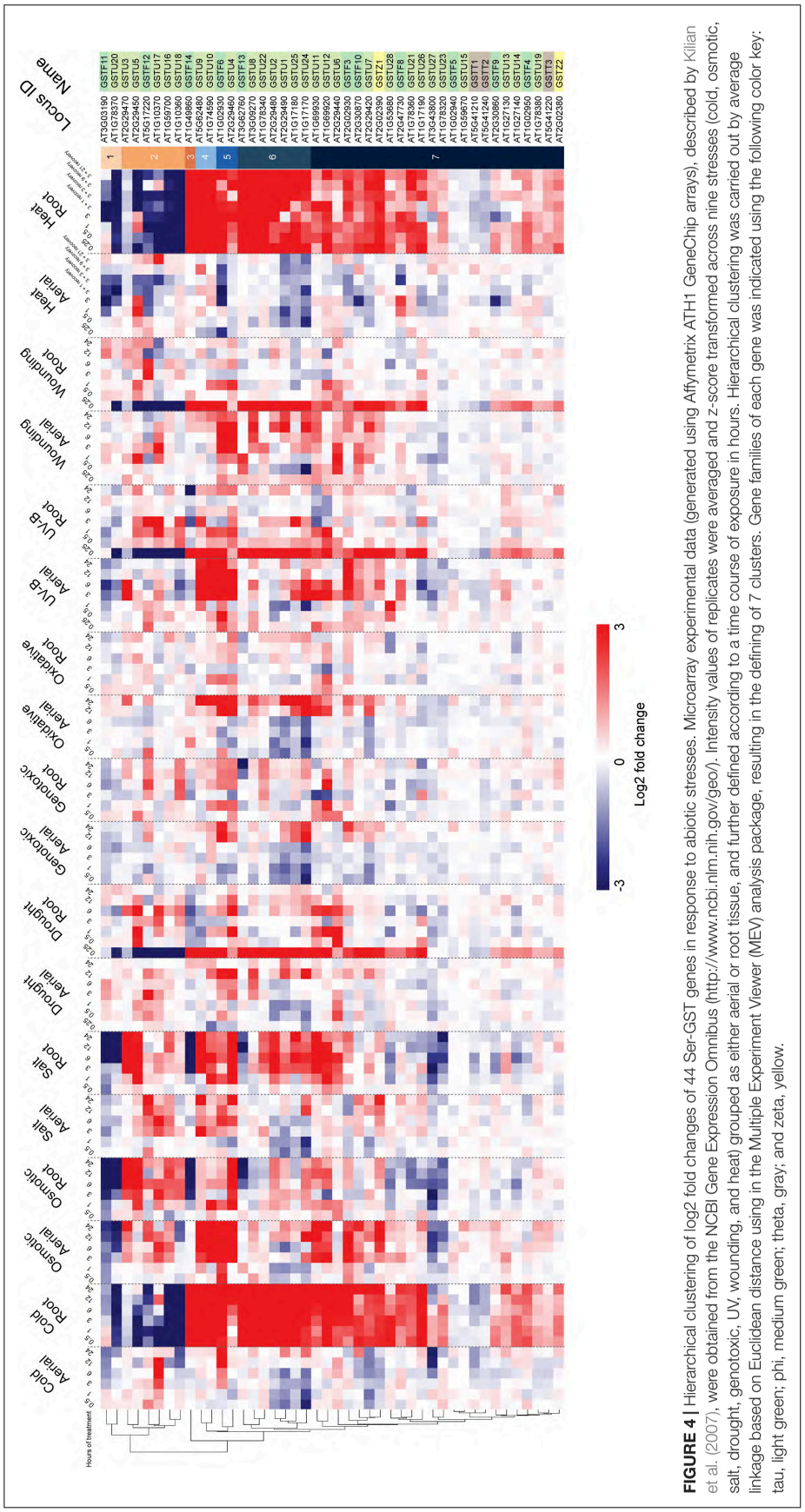



**FIGURE 4 |** Hierarchical clustering of log2 fold changes of 44 Ser-GST genes in response to abiotic stresses. Microarray experimental data (generated using Affymetrix ATH1 GeneChip arrays), described by Kilian et al. (2007), were obtained from the NCBI Gene Expression Omnibus (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Intensity values of replicates were averaged and z-score transformed across nine stresses (cold, osmotic, salt, drought, genotoxic, UV, wounding, and heat) grouped as either aerial or root tissue, and further defined according to a time course of exposure in hours. Hierarchical clustering was carried out by average linkage based on Euclidean distance using in the Multiple Experiment Viewer (MEV) analysis package, resulting in the defining of 7 clusters. Gene families of each gene was indicated using the following color key: tau, light green; phi, medium green; theta, gray; and zeta, yellow.

**TABLE 4 |** Diversity of Ser-GST functions.

| GST | Gene ID | Acronym | Known role | Mutant characterized | References |
|---|---|---|---|---|---|
| GSTU1 | At2g29490 | GST19 | | None | |
| GSTU2 | At2g29480 | GST20 | | None | |
| GSTU3 | At2g29470 | GST21 | | None | |
| GSTU4 | At2g29460 | GST22 | | None | |
| GSTU5 | At2g29450 | GSTU1, AT103-1A | UV radiation acclimation | GSTU5-OE | Liu and Li, 2002 |
| | | | Excess light acclimation response | None | Lv et al., 2015 |
| GSTU6 | At2g29440 | GST24 | | None | |
| GSTU7 | At2g29420 | GST25 | Part of the lipid stress response | None | Stotz et al., 2013 |
| GSTU8 | At3g09270 | | | None | |
| GSTU9 | At5g62480 | GST14, GST14B | Salt and drought stress response | None | Ambrosone et al., 2015 |
| GSTU10 | At1g74590 | | | None | |
| GSTU11 | At1g69930 | | | None | |
| GSTU12 | At1g69920 | | | None | |
| GSTU13 | At1g27130 | GST12 | Indole glucosinolate biosynthesis / Response to fungal pathogens (*E. pisi*, *C. gloeosporioides* and *P. cucumerin*) | *gstu13* | Piślewska-Bednarek et al., 2018 |
| GSTU14 | At1g27140 | GST13 | Part of the excess light acclimation response | None | Lv et al., 2015 |
| GSTU15 | At1g59670 | | | None | |
| GSTU16 | At1g59700 | | Part of the plant response to fungal pathogens (*V. dahliae*) | None | Pantelides et al., 2010 |
| GSTU17 | At1g10370 | ERD9, GST30, GST30B | Drought and salt stress response | GSTU17-OE and *gstu17* | Chen et al., 2012 |
| | | | Light response / Seedling development / Root elongation | GSTU17-OE and *gstu17* | Jiang et al., 2010 |
| GSTU18 | At1g10360 | GST29 | Part of the lipid stress response | None | Mueller et al., 2008 |
| GSTU19 | At1g78380 | GST8 | Drought, salt and methyl viologen stress response | GSTU19-OE | Xu et al., 2016 |
| GSTU20 | At1g78370 | FIP1 | Light response / Seedling development / Flowering time | GSTU20-OE and *gstu20* | Chen et al., 2007 |
| GSTU21 | At1g78360 | | | None | |
| GSTU22 | At1g78340 | | | None | |
| GSTU23 | At1g78320 | | | None | |
| GSTU24 | At1g17170 | GST | Lipid stress response | None | Mueller et al., 2008 |
| | | | Xenobiotic detoxification (TNT, 2,4,6-trinitrotoluene) | GSTU24-OE | Gunning et al., 2014 |
| GSTU25 | At1g17180 | | Xenobiotic detoxification (TNT, 2,4,6-trinitrotoluene) | GSTU25-OE | Gunning et al., 2014 |
| GSTU26 | At1g17190 | | Xenobiotic detoxification (herbicides) | None | Nutricati et al., 2006 |
| GSTU27 | At3g43800 | | | None | |
| GSTU28 | At1g53680 | | | None | |
| GSTF2 | At4g02520 | ATPM24, GST2 | Response to bacterial inoculation (*P. syringae*) | None | Lieberherr et al., 2003 |
| | | | Response to bacterial volatiles (*B. subtilis*) | None | Kwon et al., 2010 |
| GSTF3 | At2g02930 | GST16 | | None | |
| GSTF4 | At1g02950 | GST31 | | None | |
| GSTF5 | At1g02940 | | | None | |
| GSTF6 | At1g02930 | ERD11, GST1, GSTF3 | Response to bacterial inoculation (*P. syringae*) | None | Lieberherr et al., 2003 |
| | | | Modulation of plant metabolism in response to oxidative stress | *gstf6 gstf7 gstf9 gstf10* RNAi lines | Sappl et al., 2009 |
| | | | Camalexin biosynthesis (conjugation of GSH with IAN) | GSTF6-OE and *gstf6* | Su et al., 2011 |
| GSTF7 | At1g02920 | GST11, GSTF8 | Modulation of plant metabolism in response to oxidative stress | *gstf6 gstf7 gstf9 gstf10* RNAi lines | Sappl et al., 2009 |

*(Continued)*

**TABLE 4 |** Continued

| GST | Gene ID | Acronym | Known role | Mutant characterized | References |
|---|---|---|---|---|---|
| GSTF8 | At2g47730 | GST6, GSTF5, GSTF6 | Part of the lipid stress response | None | Mueller et al., 2008 |
| | | | Response to fungal (R. solani) and bacterial (P. syringae) pathogens | None | Gleason et al., 2011 |
| | | | Response to fungal pathogens (*F. oxysporum*) | None | Thatcher et al., 2015 |
| GSTF9 | At2g30860 | GLUTTR, GSTF7 | Xenobiotic detoxification (CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene) | None | Nutricati et al., 2006 |
| | | | Indole glucosinolate biosynthesis | None | Wentzell et al., 2007 |
| | | | Modulation of plant metabolism in response to oxidative stress | *gstf6 gstf7 gstf9 gstf10* RNAi lines | Sappl et al., 2009 |
| | | | Salt stress response | *gstf9* | Horváth et al., 2015 |
| GSTF10 | At2g30870 | | Indole glucosinolate biosynthesis | None | Wentzell et al., 2007 |
| | | | Drought and salt stress response | GSTF10-OE and *gstf10* RNA lines | Ryu et al., 2009 |
| | | | Modulation of plant metabolism in response to oxidative stress | *gstf6 gstf7 gstf9 gstf10* RNAi lines | Sappl et al., 2009 |
| GSTF11 | At3g03190 | GSTF6 | Aliphatic glucosinolate biosynthesis | None | Wentzell et al., 2007 |
| GSTF12 | At5g17220 | TT19 | Flavonoid storage (anthocyanins and proanthocyanidins) | *gstfl12/tt19* | Kitamura et al., 2004; Sun et al., 2012 |
| | | | Response to fungal pathogens (*V. dahliae*) | None | Pantelides et al., 2010 |
| GSTF13 | At3g62760 | | | None | |
| GSTF14 | At1g49860 | | Response to virus infection (BSCTV, beet severe curly top virus) | None | Yang et al., 2013 |
| GSTT1 | At5g41210 | GST10 | | None | |
| GSTT2 | At5g41240 | GST10B | Systemic acquired resistance | *gstt2* | Banday and Nandi, 2018 |
| GSTT3 | At5g41220 | GST10C | | None | |
| GSTZ1 | At2g02390 | GST18, GSTZ1, MAAI | Tyrosine catabolism | None | Edwards and Dixon, 2000 |
| GSTZ2 | At2g02380 | | | None | |
| TCHQD | At1g77290 | | | None | |

to wild-type plants, toward the fungal pathogens *Erysiphe pisi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Plectosphaerella cucumerina* (Piślewska-Bednarek et al., 2018). It was demonstrated that this phenotype is essentially due to a decrease in the biosynthesis of indole glucosinolates (IG; defense-related compounds found in Brassicaceae), where GSTU13 plays a catalytic role in conjugating GSH to IG precursors, affecting the innate immune system of *A. thaliana* plants. *GSTU16* is another member that was proposed to be part of the plant response to fungal pathogens (e.g., *Verticillium dahliae*) (Pantelides et al., 2010). However, the mechanism by which GSTU16 participates in this response still needs to be addressed.

Both biotic and abiotic stresses lead to the formation of non-enzymatically formed oxylipins, such as phytoprostanes, resulting from the oxidation of several types of lipids (most probably in response to the accumulation of stress-mediated free radicals and reactive oxygen species). These compounds serve as signaling molecules to adapt the plant response to environmental constraints, but may also enhance oxidative stress damages. Thus, their homeostasis should be tightly regulated. Interestingly, it has been shown that GSH-conjugation participates in this process, in particular in response to a *Pseudomonas syringae* infection (Mueller et al., 2008). In addition, the expression of several *GSTU* genes was shown to be responsive to phytoprostanes (i.e., *GSTU7*, *GSTU18*, and *GSTU24*) indicating that they may regulate phytoprostane homeostasis or be involved in the general detoxification pathways (Mueller et al., 2008; Stotz et al., 2013).

GSTFs constitute the second largest class of Ser-GSTs in plants, with 13 members in *A. thaliana* (Wagner et al., 2002). The GSTF1 sequence that was initially described (Bartling et al., 1993) is no longer present in the final reference genome of this plant.

As GSTUs, GSTFs are associated with the plant response to various abiotic and biotic stresses. For instance, *A. thaliana gstf9* and *gstf10* mutants are more sensitive to a salt stress than wild-type plants (Ryu et al., 2009; Horváth et al., 2015). In contrast, overexpression of *GSTF10* confers higher tolerance to salt. Together these data indicate that the *A. thaliana* GSTF9 and GSTF10 play a positive role in the plant response to a salt stress. However, several reports indicate that the role of *GSTF9* and *GSTF10* extends beyond. *GSTF10* was proposed to play a role in modulating developmental processes, such as the brassinosteroid-independent spontaneous cell death, a mechanism that is mediated by the production of reactive oxygen species (Ryu et al., 2009). *GSTF9* and *GSTF10*, as well as *GSTF11*, are also involved in the biosynthesis of glucosinolates (Wentzell et al., 2007). Whether GSTF9, GSTF10 and GSTF11 act in concert with GSTU13 in this process (Piślewska-Bednarek et al., 2018) remains to be investigated. GSTF9 and GSTF10, together with

GSTF6 and GSTF7, also play a role in limiting the metabolic changes that arise during oxidative stress (Sappl et al., 2009).

Additionally, GSTF6 activity is required for the biosynthesis of camalexin, the main phytoalexin (i.e., secondary metabolite with antimicrobial activity) present in *A. thaliana* (Su et al., 2011). The proposed role of GSTF6 in this process is to catalyze the conjugation of GSH on indole-3-acetonitrile (IAN), leading to the formation of GSH-IAN, the main precursor of camalexin biosynthesis. The above-mentioned functional roles of GSTF6 are in agreement with its first proposed biological function, which was to participate in defense mechanisms against pathogens (e.g., *P. syringae*), together with GSTF2 (Lieberherr et al., 2003; Kwon et al., 2010). GSTF8, GSTF12, and GSTF14 activities are associated with the *A. thaliana* response to various pathogens, including viruses (Pantelides et al., 2010; Gleason et al., 2011; Yang et al., 2013; Thatcher et al., 2015). GSTF8 and GSTF9 have been identified as potential actors of the lipid stress response and xenobiotic detoxification machinery, respectively (Nutricati et al., 2006; Mueller et al., 2008).

GSTF12 is another member of the phi class whose function has been extensively studies. GSTF12 is also known as TRANSPARENT TESTA 19 (TT19) and plays a key role in the control of anthocyanin and proanthocyanidin vacuolar accumulation in *A. thaliana* vegetative tissues and seed testa, respectively (Kitamura et al., 2004). In this process, TT19 acts as a carrier to convey these cytosolic flavonoids to the tonoplasts (Sun et al., 2012).

No more physiological information is available for other Ser-GST classes, namely GSTT, GSTZ, and TCHQD (3, 2, and 1 members in *A. thaliana*, respectively). *A. thaliana* GSTT2 seems involved in the modulation of systemic acquired resistance by altering the expression of key genes involved in this process through epigenetic modifications (Banday and Nandi, 2018). According to its capacity to catalyze the isomerisation of maleylacetoacetate into fumarylacetoacetate *in vitro*, AtGSTZ1 is likely involved in tyrosine catabolism, as demonstrated in animals (Edwards and Dixon, 2000). However, there is no mutant described so far and there is a second gene in *A. thaliana*, the biochemical properties of the protein having not yet been explored. Moreover, AtGSTZ1 was also able to catalyze the GSH-dependent dehalogenation of dichloroacetic acid to glyoxylic acid, suggesting other possible functions *in planta*. Finally, there is to date no clear function attributed to the sole member of the TCHQD class, either in *A. thaliana* or in another photosynthetic organisms.

## CONCLUSION

The GST gene family was subject to a huge genetic expansion in terrestrial plants, with an average number of GSTs around 58 but also in some particular fungi (up to 45 isoforms) (Morel et al., 2013) compared to the 6–17 genes found in bacteria, yeast or mammals. This is linked to expansion within one or several classes as GSTU in plants. Genomic organization and phylogenetic analyses indicate that most duplication events responsible for the expansion of the GSTF and GSTU classes are species-specific. Among Ser-GSTs in plants, the GSTFs and GSTUs are highly represented, and have more diversified primary sequences and catalytic signatures compared to GSTs from the theta, zeta and TCHQD classes. This is likely at the origin of their broader range of activities and set of accommodated substrates/ligands.

According to their stress-inducible expression, it is documented that many GSTFs and GSTUs have functions connected to secondary metabolism, as exemplified by their implication in the vacuolar sequestration of anthocyanin, in the biosynthesis of camalexin, and/or in the binding of biosynthesis intermediates (porphyrin derivatives) or cellular by-products (oxylipins). Their implication in xenobiotic detoxification, such as herbicides, has likely little to do with their ancestral functions, that still remain to be delineated in many cases. However, this has led to the development of biotechnological applications in agriculture and environmental sciences [see the review in this research topic by Perperopoulou et al. (2018)]. The GSTs being targeted for the development of transgenic plants are linked to conferring tolerances against biotic and abiotic stresses or expressing engineered xenobiotic metabolizing enzymes for the bioremediation and detoxification of agrochemicals and pollutants.

To reveal the functions of Ser-GSTs, future studies will have to take into account the redundancy that most probably exists within and between the different classes of Ser-GSTs, which has limited the otherwise powerful reverse-genetic strategy. In order to inventory molecules able to bind GSTs, *in vivo* and *in vitro* ligand-fishing approaches have been used successfully in several cases (Dixon et al., 2011b; Dixon and Edwards, 2018). However, determining the nature of the identified molecules and whether, when and how they are conjugated with GSH or just bound to GSTs is a technically challenging and time-consuming task. For instance, out of the 43 structures of Ser-GSTs available to date in the Protein Data Bank, only 6 are solved with bound ligands. Hence, the validation of the physiological relevance of the detected interactions remains a major challenge.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

ES-G, AH, and NR carried out the *in silico* genome analyses. SL and OK performed the transcriptomic analyses. ClD and MS performed structural data analyses. KR and ChD compiled data presented in **Table 4**. All authors participated to the writing of the manuscript.

## FUNDING

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). OK is supported by the Swedish Research Council "VetenskapsRådet" (grant: 621-2014-4688) and the Kempe Foundations (Gunnar Öquist Fellowship). AH, ChD, NR, and KR are supported by the French National Research Agency (ANR-17-CE20-0008-01).

## REFERENCES


Ahmad, L., Rylott, E. L., Bruce, N. C., Edwards, R., and Grogan, G. (2017). Structural evidence for *Arabidopsis* glutathione transferase At GSTF2 functioning as a transporter of small organic ligands. *FEBS Open Bio* 7, 122–132. doi: 10.1002/2211-5463.12168

Ahsan, N., Lee, D.-G., Alam, I., Kim, P. J., Lee, J. J., Ahn, Y.-O., et al. (2008). Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics* 8, 3561–3576. doi: 10.1002/pmic.200701189

Alfenito, M. R. (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell Online* 10, 1135–1150. doi: 10.1105/tpc.10.7.1135

Ambrosone, A., Batelli, G., Nurcato, R., Aurilia, V., Punzo, P., Bangarusamy, D. K., et al. (2015). The *Arabidopsis* RNA-binding protein AtRGGA regulates tolerance to salt and drought stress. *Plant Physiol.* 168, 292–306. doi: 10.1104/pp.114.255802

Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A. C., and Labrou, N. E. (2009a). Crystallographic and functional characterization of the fluorodifen-inducible glutathione transferase from *Glycine max* reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site. *J. Mol. Biol.* 385, 984–1002. doi: 10.1016/j.jmb.2008.10.084

Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A. C., and Labrou, N. E. (2009b). Crystal structure of *Glycine max* glutathione transferase in complex with glutathione: investigation of the mechanism operating by the Tau class glutathione transferases. *Biochem. J.* 422, 247–256. doi: 10.1042/BJ20090224

Axarli, I., Georgiadou, C., Dhavala, P., Papageorgiou, A. C., and Labrou, N. E. (2010). Investigation of the role of conserved residues Ser13, Asn48 and Pro49 in the catalytic mechanism of the tau class glutathione transferase from *Glycine max*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Proteins Proteom.* 1804, 662–667. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.10.016

Axarli, I., Muleta, A. W., Vlachakis, D., Kossida, S., Kotzia, G., Maltezos, A., et al. (2016). Directed evolution of Tau class glutathione transferases reveals a site that regulates catalytic efficiency and masks co-operativity. *Biochem. J.* 473, 559–570. doi: 10.1042/BJ20150930

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

Banday, Z. Z., and Nandi, A. K. (2018). *Arabidopsis thaliana* GLUTATHIONE-S -TRANSFERASE THETA 2 interacts with RSI1/FLD to activate systemic acquired resistance: GSTT2 interacts with FLD and regulates SAR. *Mol. Plant Pathol.* 19, 464–475. doi: 10.1111/mpp.12538

Bartling, D., Radzio, R., Steiner, U., and Weiler, E. W. (1993). A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. Molecular cloning and functional characterization. *Eur. J. Biochem.* 216, 579–586. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18177.x

Bilang, J., Macdonald, H., King, P. J., and Sturm, A. (1993). A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione S-transferase. *Plant Physiol.* 102, 29–34. doi: 10.1104/pp.102.1.29

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

Board, P. G., and Menon, D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subjects* 1830, 3267–3288. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.019

Booth, J., Boyland, E., and Sims, P. (1961). An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.* 79, 516–524. doi: 10.1042/bj0790516

Bryant, D., Cummins, I., Dixon, D. P., and Edwards, R. (2006). Cloning and characterization of a theta class glutathione transferase from the potato pathogen *Phytophthora infestans*. *Phytochemistry* 67, 1427–1434. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.05.012

Buetler, T. M., and Eaton, D. L. (1992). Complementary DNA cloning, messenger RNA expression, and induction of alpha-class glutathione S-transferases in mouse tissues. *Cancer Res.* 52, 314–318.

Burmeister, C., Lüersen, 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, C.-Y., Ho, S.-S., Kuo, T.-Y., Hsieh, H.-L., and Cheng, Y.-S. (2017). Structural basis of jasmonate-amido synthetase FIN219 in complex with glutathione S-transferase FIP1 during the JA signal regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E1815–E1824. doi: 10.1073/pnas.1609980114

Chen, I.-C., Huang, I.-C., Liu, M.-J., Wang, Z.-G., Chung, S.-S., and Hsieh, H.-L. (2007). Glutathione S-transferase interacting with far-red insensitive 219 is involved in phytochrome A-mediated signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143, 1189–1202. doi: 10.1104/pp.106.094185

Chen, J.-H., Jiang, H.-W., Hsieh, E.-J., Chen, H.-Y., Chien, C.-T., Hsieh, H.-L., et al. (2012). Drought and salt stress tolerance of an arabidopsis glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. *Plant Physiol.* 158, 340–351. doi: 10.1104/pp.111.181875

Cho, H.-Y., Lee, H. J., and Kong, K.-H. (2007). A phi class glutathione S-transferase from *Oryza sativa* (OsGSTF5): molecular cloning, expression and biochemical characteristics. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 511–516. doi: 10.5483/bmbrep.2007.40.4.511

Chronopoulou, E., Ataya, F. S., Pouliou, F., Perperopoulou, F., Georgakis, N., Nianiou-Obeidat, I., et al. (2017a). "Structure, evolution and functional roles of plant glutathione transferases," in *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*, eds M. A. Hossain, M. G. Mostofa, P. Diaz-Vivancos, D. J. Burritt, M. Fujita, and L.-S. P. Tran (Cham: Springer International Publishing), 195–213. doi: 10.1007/978-3-319-66682-2_9

Chronopoulou, E., Georgakis, N., Nianiou-Obeidat, I., Madesis, P., Perperopoulou, F., Pouliou, F., et al. (2017b). "Plant glutathione transferases in abiotic stress response and herbicide resistance," in *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*, eds M. A. Hossain, M. G. Mostofa, P. Diaz-Vivancos, D. J. Burritt, M. Fujita, and L.-S. P. Tran (Cham: Springer International Publishing), 215–233. doi: 10.1007/978-3-319-66682-2_10

Coggan, M., Flanagan, J. U., Parker, M. W., Vichai, V., Pearson, W. R., and Board, P. G. (2002). Identification and characterization of GSTT3, a third murine theta class glutathione transferase. *Biochem. J.* 366, 323–332. doi: 10.1042/bj20011878

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

Combes, B., and Stakelum, G. S. (1961). A liver enzyme that conjugates sulfobromophtalein sodium with glutathione. *J. Clin. Investig.* 40, 981–988. doi: 10.1172/JCI104337

Conn, S., Curtin, C., Bézier, A., Franco, C., and Zhang, W. (2008). Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *J. Exp. Bot.* 59, 3621–3634. doi: 10.1093/jxb/ern217

Cummins, I., Dixon, D. P., Freitag-Pohl, S., Skipsey, M., and Edwards, R. (2011). Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metabol. Rev.* 43, 266–280. doi: 10.3109/03602532.2011.552910

Cummins, I., O'Hagan, D., Jablonkai, I., Cole, D. J., Hehn, A., Werck-Reichhart, D., et al. (2003). Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat. *Plant Mol. Biol.* 52, 591–603.

Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subjects* 1830, 3217–3266. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.018

DeRidder, B. P. (2002). Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners. *Plant Physiol.* 130, 1497–1505. doi: 10.1104/pp.010066

Ding, N., Wang, A., Zhang, X., Wu, Y., Wang, R., Cui, H., et al. (2017). Identification and analysis of glutathione S-transferase gene family in sweet potato reveal divergent GST-mediated networks in aboveground and underground tissues in response to abiotic stresses. *BMC Plant Biol.* 17:225. doi: 10.1186/s12870-017-1179-z

Dixon, D. P., Cummins, I., Cole, D. J., and Edwards, R. (1998). Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 258–266. doi: 10.1016/S1369-5266(98)80114-3

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., and Edwards, R. (2018). Protein-ligand fishing in planta for biologically active natural products using glutathione transferases. *Front. Plant Sci.* 9:1659. doi: 10.3389/fpls.2018.01659

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., and Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* 3:REVIEWS3004.

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., McEwen, A. G., Lapthorn, A. J., and Edwards, R. (2003). Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* 278, 23930–23935. doi: 10.1074/jbc.M303620200

Dixon, D. P., Sellars, J. D., and Edwards, R. (2011a). The *Arabidopsis* phi class glutathione transferase At GSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. *Biochem. J.* 438, 63–70. doi: 10.1042/BJ20101884

Dixon, D. P., Steel, P. G., and Edwards, R. (2011b). Roles for glutathione transferases in antioxidant recycling. *Plant Signal. Behav.* 6, 1223–1227. doi: 10.4161/psb.6.8.16253

Droog, F. (1997). Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *J. Plant Growth Regul.* 16, 95–107. doi: 10.1007/PL00006984

Droog, F. N. J., Hooykaas, P. J. J., and Van Der Zaal, B. J. (1995). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated type-III tobacco glutathione S-transferases. *Plant Physiol.* 107, 1139–1146. doi: 10.1104/pp.107.4.1139

Edwards, R., and Dixon, D. P. (2000). The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. *Environ. Fate Saf. Manage. Agrochem.* 19, 216–222.

Edwards, T. E., Bryan, C. M., Leibly, D. J., Dieterich, S. H., Abendroth, J., Sankaran, B., et al. (2011). Structures of a putative -class glutathione-S-transferase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 1038–1043. doi: 10.1107/S1744309111009493

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

Fernández-Cañón, J. M., and Peñalva, M. A. (1998). Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J. Biol. Chem.* 273, 329–337. doi: 10.1074/jbc.273.1.329

Frear, D. S., and Swanson, H. R. (1970). Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino- 2-s-triazino) glutathione: partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry* 9, 2123–2132. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85377-7

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

Gallé, Á, Csiszár, J., Secenji, M., Guóth, A., Cseuz, L., Tari, I., et al. (2009). Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: response to water deficit. *J. Plant Physiol.* 166, 1878–1891. doi: 10.1016/j.jplph.2009.05.016

Gleason, C., Huang, S., Thatcher, L. F., Foley, R. C., Anderson, C. R., Carroll, A. J., et al. (2011). Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10768–10773. doi: 10.1073/pnas.1016060108

Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N., and Ageorges, A. (2011). In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST: anthocyanin trafficking in grapevine. *Plant J.* 67, 960–970. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04648.x

Gong, H., Jiao, Y., Hu, W., and Pua, E. (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. doi: 10.1007/s11103-004-4516-1

Gonneau, M., Mornet, R., and Laloue, M. (1998). A Nicotiana plumbaginifolia protein labeled with an azido cytokinin agonist is a glutathione S-transferase. *Physiol. Plant.* 103, 114–124. doi: 10.1034/j.1399-3054.1998.1030114.x

Gonzalez, D., Fraichard, S., Grassein, P., Delarue, P., Senet, P., Nicolaï, A., et al. (2018). Characterization of a *Drosophila* glutathione transferase involved in isothiocyanate detoxification. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 95, 33–43. doi: 10.1016/j.ibmb.2018.03.004

Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., et al. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 40, D1178–D1186. doi: 10.1093/nar/gkr944

Gronwald, J. W., and Plaisance, K. L. (1998). Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from sorghum. *Plant Physiol.* 117, 877–892. doi: 10.1104/pp.117.3.877

Gunning, V., Tzafestas, K., Sparrow, H., Johnston, E. J., Brentnall, A. S., Potts, J. R., et al. (2014). *Arabidopsis* glutathione transferases U24 and U25 exhibit a range of detoxification activities with the environmental pollutant and explosive, 2,4,6-trinitrotoluene. *Plant Physiol.* 165, 854–865. doi: 10.1104/pp.114.237180

Habig, W. H., Pabst, M. J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I. M., and Jakoby, W. B. (1974). The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 3879–3882. doi: 10.1073/pnas.71.10.3879

Han, J.-B., Li, G.-Q., Wan, P.-J., Zhu, T.-T., and Meng, Q.-W. (2016). Identification of glutathione S-transferase genes in Leptinotarsa decemlineata and their expression patterns under stress of three insecticides. *Pesticide Biochem. Physiol.* 133, 26–34. doi: 10.1016/j.pestbp.2016.03.008

Hayes, J. D., and McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31, 273–300. doi: 10.1080/10715769900300851

Hayes, J. D., and Pulford, D. J. (1995). The glut athione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the lsoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445–520. doi: 10.3109/10409239509083491

He, G., Guan, C.-N., Chen, Q.-X., Gou, X.-J., Liu, W., Zeng, Q.-Y., et al. (2016). Genome-wide analysis of the glutathione S-transferase gene family in capsella rubella: identification, expression, and biochemical functions. *Front. Plant Sci.* 7:1325. doi: 10.3389/fpls.2016.01325

Horváth, E., Bela, K., Papdi, C., Gallé, Á, Szabados, L., Tari, I., et al. (2015). The role of *Arabidopsis* glutathione transferase F9 gene under oxidative stress in seedlings. *Acta Biol. Hungarica* 66, 406–418. doi: 10.1556/018.66.2015.4.5

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. doi: 10.1042/bj3320097

Islam, S., Rahman, I. A., Islam, T., and Ghosh, A. (2017). Genome-wide identification and expression analysis of glutathione S-transferase gene family in tomato: gaining an insight to their physiological and stress-specific roles. *PLoS One* 12:e0187504. doi: 10.1371/journal.pone.01875004

Jakobsson, P. J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., and 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. doi: 10.1110/ps.8.3.689

Jakoby, W. B. (1978). The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 46, 383–414. doi: 10.1002/9780470122914.ch6

Jha, B., Sharma, A., and Mishra, A. (2011). Expression of SbGSTU (tau class glutathione S-transferase) gene isolated from *Salicornia brachiata* in tobacco for salt tolerance. *Mol. Biol. Rep.* 38, 4823–4832. doi: 10.1007/s11033-010-0625-x

Jiang, H.-W., Liu, M.-J., Chen, I.-C., Huang, C.-H., Chao, L.-Y., and Hsieh, H.-L. (2010). A glutathione S-transferase regulated by light and hormones participates in the modulation of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol.* 154, 1646–1658. doi: 10.1104/pp.110.159152

Kao, C. W., Bakshi, M., Sherameti, I., Dong, S., Reichelt, M., Oelmüller, R., et al. (2016). A Chinese cabbage (Brassica campetris subsp. Chinensis) -type

glutathione-S-transferase stimulates Arabidopsis development and primes against abiotic and biotic stress. *Plant Mol. Biol.* 92, 643–659. doi: 10.1007/s11103-016-0531-2

Keppler, D. (1999). Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 985–991. doi: 10.1016/s0891-5849(99)00171-9

Ketley, J. N., Habig, W. H., and Jakoby, W. B. (1975). Binding of nonsubstrate ligands to the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 250, 8670–8673.

Khan, N., Hu, C., Amjad Khan, W., and Hou, X. (2018). Genome-wide identification, classification, and expression divergence of glutathione-transferase family in *Brassica rapa* under multiple hormone treatments. *BioMed. Res. Int.* 2018, 1–19. doi: 10.1155/2018/6023457

Kiefer, P. M., and Copley, S. D. (2002). Characterization of the initial steps in the reductive dehalogenation catalyzed by tetrachlorohydroquinone dehalogenase †. *Biochemistry* 41, 1315–1322. doi: 10.1021/bi0117504

Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., et al. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses: AtGenExpress global abiotic stress data set. *Plant J.* 50, 347–363. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03052.x

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., Akita, Y., Ishizaka, H., Narumi, I., and Tanaka, A. (2012). Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in cyclamen. *J. Plant Physiol.* 169, 636–642. doi: 10.1016/j.jplph.2011.12.011

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

Kraus, P. (1980). Resolution, purification and some properties of three glutathione transferases from rat liver mitochondria. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 9–15.

Kwon, Y. S., Ryu, C.-M., Lee, S., Park, H. B., Han, K. S., Lee, J. H., et al. (2010). Proteome analysis of *Arabidopsis* seedlings exposed to bacterial volatiles. *Planta* 232, 1355–1370. doi: 10.1007/s00425-010-1259-x

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

Lallement, P.-A., Meux, E., Gualberto, J. M., Dumarcay, S., Favier, F., Didierjean, C., et al. (2015). Glutathionyl-hydroquinone reductases from poplar are plastidial proteins that deglutathionylate both reduced and oxidized glutathionylated quinones. *FEBS Lett.* 589, 37–44. doi: 10.1016/j.febslet.2014.11.021

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., 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

Larsen, E. S., Alfenito, M. R., Briggs, W. R., and Walbot, V. (2003). A carnation anthocyanin mutant is complemented by the glutathione S-transferases encoded by maize Bz2 and petunia An9. *Plant Cell Rep.* 21, 900–904. doi: 10.1007/s00299-002-0545-x

Lederer, B., and Böger, P. (2003). Binding and protection of porphyrins by glutathione S-transferases of *Zea mays* L. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subjects* 1621, 226–233. doi: 10.1016/S0304-4165(03)00073-4

Lederer, B., and Böger, P. (2005). A ligand function of glutathione S-transferase, *Z. Naturforsch. C.* 60, 166–171. doi: 10.1515/znc-2005-3-403

Levi, A. J., and Arias, I. M. (1969). Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. *J. Clin. Invest.* 48, 2156–2167. doi: 10.1172/JCI106182

Lieberherr, D., Wagner, U., Dubuis, P.-H., Métraux, J.-P., and Mauch, F. (2003). The rapid induction of glutathione S-transferases AtGSTF2 and AtGSTF6 by avirulent *Pseudomonas* syringae is the result of combined salicylic acid and ethylene signaling. *Plant Cell Physiol.* 44, 750–757. doi: 10.1093/pcp/pcg093

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, X.-F., and Li, J.-Y. (2002). [Characterization of an ultra-violet inducible gene that encodes glutathione S-transferase in *Arabidopsis thaliana*]. *Yi Chuan Xue Bao* 29, 458–460.

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

Lv, F., Zhou, J., Zeng, L., and Xing, D. (2015). -cyclocitral upregulates salicylic acid signalling to enhance excess light acclimation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 66, 4719–4732. doi: 10.1093/jxb/erv231

Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M., et al. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7202–7206. doi: 10.1073/pnas.82.21.7202

Mannervik, B., and Danielson, U. H. (1988). Glutathione transferases–structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283–337.

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

Marrs, K. A., Alfenito, M. R., Lloyd, A. M., and Walbot, V. (1995). A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature* 375, 397–400. doi: 10.1038/375397a0

Marsh, M., Shoemark, D. K., Jacob, A., Robinson, C., Cahill, B., Zhou, N.-Y., et al. (2008). Structure of bacterial glutathione-S-transferase maleyl pyruvate isomerase and implications for mechanism of isomerisation. *J. Mol. Biol.* 384, 165–177. doi: 10.1016/j.jmb.2008.09.028

Martínez-Márquez, A., Martínez-Esteso, M. J., Vilella-Antón, M. T., Sellés-Marchart, S., Morante-Carriel, J. A., Hurtado, E., et al. (2017). A tau class glutathione-S-transferase is involved in trans-resveratrol transport out of grapevine cells. *Front. Plant Sci.* 8:1457. doi: 10.3389/fpls.2017.01457

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

Mashiyama, S. T., Malabanan, M. M., Akiva, E., Bhosle, R., Branch, M. C., Hillerich, B., et al. (2014). Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. *PLoS Biol.* 12:e1001843. doi: 10.1371/journal.pbio.1001843

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., Gérardin, P., Jacquot, J.-P., Dumarçay, 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., Ngadin, A., Didierjean, C., Morel, M., Dumarçay, 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

Momose, M., Itoh, Y., Umemoto, N., Nakayama, M., and Ozeki, Y. (2013). Reverted glutathione S-transferase-like genes that influence flower color intensity of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) originated from excision of a transposable element. *Breed. Sci.* 63, 435–440. doi: 10.1270/jsbbs.63.435

Monticolo, F., Colantuono, C., and Chiusano, M. L. (2017). Shaping the evolutionary tree of green plants: evidence from the GST family. *Sci. Rep.* 7:14363. doi: 10.1038/s41598-017-14316-w

Moons, A. (2003). Osgstu3 and osgtu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots 1. *FEBS Lett.* 553, 427–432. doi: 10.1016/S0014-5793(03)01077-9

Moons, A. (2005). "Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione s-transferases (GSTs)," in *Vitamins &*

*Hormones*, (Amsterdam: Elsevier), 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: fungal xenomic networks. *Microb. Biotechnol.* 6, 248–263. doi: 10.1111/1751-7915.12015

Mueller, L. A., Goodman, C. D., Silady, R. A., and Walbot, V. (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123, 1561–1570. doi: 10.1104/pp.123.4.1561

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 Online* 20, 768–785. doi: 10.1105/tpc.107.054809

Munyampundu, J.-P., Xu, Y.-P., and Cai, X.-Z. (2016). Phi class of glutathione S-transferase gene superfamily widely exists in nonplant taxonomic groups. *Evol. Bioinform.* 12:EBO.S35909. doi: 10.4137/EBO.S35909

Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., et al. (2006). Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* 142, 1364–1379. doi: 10.1104/pp.106.089458

Neuefeind, T., Huber, R., Dasenbrock, H., Prade, L., and Bieseler, B. (1997a). Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. *J. Mol. Biol.* 274, 446–453. doi: 10.1006/jmbi.1997.1402

Neuefeind, T., Huber, R., Reinemer, P., Knäblein, J., Prade, L., Mann, K., et al. (1997b). Cloning, sequencing, crystallization and X-ray structure of glutathione S-transferase-III from *Zea mays* var. mutin: a leading enzyme in detoxification of maize herbicides. *J. Mol. Biol.* 274, 577–587. doi: 10.1006/jmbi.1997.1401

Nutricati, E., Miceli, A., Blando, F., and De Bellis, L. (2006). Characterization of two *Arabidopsis* thaliana glutathione S-transferases. *Plant Cell Rep.* 25, 997–1005. doi: 10.1007/s00299-006-0146-1

Pantelides, I. S., Tjamos, S. E., and Paplomatas, E. J. (2010). Ethylene perception via ETR1 is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*. *Mol. Plant Pathol.* 11, 191–202. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00592.x

Pégeot, H., Koh, C. S., Petre, B., Mathiot, S., Duplessis, S., Hecker, A., et al. (2014). The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1. *Front. Plant Sci.* 5:712. doi: 10.3389/fpls.2014.00712

Pégeot, H., Mathiot, S., Perrot, T., Gense, F., Hecker, A., Didierjean, C., et al. (2017). Structural plasticity among glutathione transferase Phi members: natural combination of catalytic residues confers dual biochemical activities. *FEBS J.* 284, 2442–2463. doi: 10.1111/febs.14138

Pemble, S. E., and Taylor, J. B. (1992). An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochem. J.* 287(Pt 3), 957–963. doi: 10.1042/bj2870957

Perperopoulou, F., Pouliou, F., and Labrou, N. E. (2018). Recent advances in protein engineering and biotechnological applications of glutathione transferases. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38, 511–528. doi: 10.1080/07388551.2017.1375890

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., et al. (2004). UCSF chimera–a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. doi: 10.1002/jcc.20084

Piślewska-Bednarek, M., Nakano, R. T., Hiruma, K., Pastorczyk, M., Sanchez-Vallet, A., Singkaravanit-Ogawa, S., et al. (2018). Glutathione transferase U13 functions in pathogen-triggered glucosinolate metabolism. *Plant Physiol.* 176, 538–551. doi: 10.1104/pp.17.01455

Plomion, C., Aury, J.-M., Amselem, J., Leroy, T., Murat, F., Duplessis, S., et al. (2018). Oak genome reveals facets of long lifespan. *Nat. Plants* 4, 440–452. doi: 10.1038/s41477-018-0172-3

Prade, L., Huber, R., and Bieseler, B. (1998). Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase – explanations for the selectivity of the enzyme in plants. *Structure* 6, 1445–1452. doi: 10.1016/S0969-2126(98)00143-9

Rahantaniaina, M.-S., Li, S., Chatel-Innocenti, G., Tuzet, A., Mhamdi, A., Vanacker, H., et al. (2017). Glutathione oxidation in response to intracellular $H_2O_2$: key but overlapping roles for dehydroascorbate reductases. *Plant Signal Behav.* 12:e1356531. doi: 10.1080/15592324.2017.1356531

Reddy, G. V. B., 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

Reid, R., Gridley, K., Kawamata, Y., and Zhu, Y. (2013). Arsenite elicits anomalous sulfur starvation responses in barley. *Plant Physiol.* 162, 401–409. doi: 10.1104/pp.113.216937

Reinemer, P., Prade, L., Hof, P., Neuefeind, T., Huber, R., Zettl, R., et al. (1996). Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J. Mol. Biol.* 255, 289–309. doi: 10.1006/jmbi.1996.0024

Rinaldi, C., Kohler, A., Frey, P., Duchaussoy, F., Ningre, N., Couloux, A., et al. (2007). Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici*-populina. *Plant Physiol.* 144, 347–366. doi: 10.1104/pp.106.094987

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. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59, 143–166. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092811

Ryu, H. Y., Kim, S. Y., Park, H. M., You, J. Y., Kim, B. H., Lee, J. S., et al. (2009). Modulations of AtGSTF10 expression induce stress tolerance and BAK1-mediated cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 417–422. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.11.156

Sappl, P. G., Carroll, A. J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Harvey Millar, A., et al. (2009). The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress: genomic and reverse genetic analysis of plant GSTs. *Plant J.* 58, 53–68. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03761.x

Sappl, P. G., Oñate-Sánchez, L., Singh, K. B., and Millar, A. H. (2004). Proteomic analysis of glutathione S -transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Mol. Biol.* 54, 205–219. doi: 10.1023/B:PLAN.0000028786.57439.b3

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

Schwartz, M., Didierjean, C., Hecker, A., Girardet, J.-M., Morel-Rouhier, M., Gelhaye, E., et al. (2016). Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* ECM4, a Xi-class glutathione transferase that reacts with glutathionyl-(hydro)quinones. *PLoS One* 11:e0164678. doi: 10.1371/journal.pone.0164678

Shah, D. M., Hironaka, C. M., Wiegand, R. C., Harding, E. I., Krivi, G. G., and Tiemeier, D. C. (1986). Structural analysis of a maize gene coding for glutathione-S-transferase involved in herbicide detoxification. *Plant Mol. Biol.* 6, 203–211. doi: 10.1007/BF00015226

Shao, Y., Lv, Z., Li, C., Zhang, W., Duan, X., Qiu, Q., et al. (2017). Molecular cloning and functional characterization of theta class glutathione S-transferase from *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellf. Immunol.* 63, 31–39. doi: 10.1016/j.fsi.2017.02.004

Skopelitou, K., Muleta, A. W., Papageorgiou, A. C., Chronopoulou, E., and Labrou, N. E. (2015). Catalytic features and crystal structure of a tau class glutathione transferase from *Glycine max* specifically upregulated in response to soybean mosaic virus infections. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Proteins Proteom.* 1854, 166–177. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.11.008

Skopelitou, K., Muleta, A. W., Pavli, O., Skaracis, G. N., Flemetakis, E., Papageorgiou, A. C., et al. (2012). Overlapping protective roles for glutathione transferase gene family members in chemical and oxidative stress response in *Agrobacterium tumefaciens*. *Funct. Integr. Genomics* 12, 157–172. doi: 10.1007/s10142-011-0248-x

Smith, A. P., DeRidder, B. P., Guo, W.-J., Seeley, E. H., Regnier, F. E., and Goldsbrough, P. B. (2004). Proteomic analysis of *Arabidopsis* glutathione S-transferases from benoxacor- and copper-treated seedlings. *J. Biol. Chem.* 279, 26098–26104. doi: 10.1074/jbc.M402807200

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

Soranzo, N., Sari Gorla, M., Mizzi, L., De Toma, G., and Frova, C. (2004). Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol. Genet. Genomics* 271, 511–521. doi: 10.1007/s00438-004-1006-8

Srivastava, D., Verma, G., Chauhan, A. S., Pande, V., and Chakrabarty, D. (2019). Rice (*Oryza sativa* L.) tau class glutathione S -transferase (OsGSTU30) overexpression in *Arabidopsis thaliana* modulates a regulatory network leading to heavy metal and drought stress tolerance. *Metallomics* 11, 375–389. doi: 10.1039/c8mt00204e

Stotz, H. U., Mueller, S., Zoeller, M., Mueller, M. J., and Berger, S. (2013). TGA transcription factors and jasmonate-independent COI1 signalling regulate specific plant responses to reactive oxylipins. *J. Exp. Bot.* 64, 963–975. doi: 10.1093/jxb/ers389

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

Sun, Y., Li, H., and Huang, J.-R. (2012). Arabidopsis TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts. *Mol. Plant* 5, 387–400. doi: 10.1093/mp/ssr110

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

Thatcher, L. F., Kamphuis, L. G., Hane, J. K., Oñate-Sánchez, L., and Singh, K. B. (2015). The *Arabidopsis* KH-domain RNA-binding protein ESR1 functions in components of jasmonate signalling, unlinking growth restraint and resistance to stress. *PLoS One* 10:e0126978. doi: 10.1371/journal.pone.0126978

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

Tiwari, V., Patel, M. K., Chaturvedi, A. K., Mishra, A., and Jha, B. (2016). Functional characterization of the tau class glutathione-S-transferases gene (SbGSTU) promoter of salicornia brachiata under salinity and osmotic stress. *PLoS One* 11:e0148494. doi: 10.1371/journal.pone.0148494

Tossounian, M.-A., Van Molle, I., Wahni, K., Jacques, S., Gevaert, K., Van Breusegem, F., et al. (2018). Disulfide bond formation protects *Arabidopsis thaliana* glutathione transferase tau 23 from oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subjects* 1862, 775–789. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.10.007

Tripathi, A., Indoliya, Y., Tiwari, M., Tiwari, P., Srivastava, D., Kumar Verma, P., et al. (2014). Transformed yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) overexpressing rice Tau class glutathione S-transferase (OsGSTU30 and OsGSTU41) shows enhanced resistance to hexavalent chromium. *Metallomics* 6, 1549–1557. doi: 10.1039/C4MT00083H

Valenzuela-Chavira, I., Contreras-Vergara, C. A., Arvizu-Flores, A. A., Serrano-Posada, H., Lopez-Zavala, A. A., García-Orozco, K. D., et al. (2017). Insights into ligand binding to a glutathione S-transferase from mango: structure, thermodynamics and kinetics. *Biochimie* 135, 35–45. doi: 10.1016/j.biochi.2017.01.005

Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D. P., and Mauch, F. (2002). Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* 49, 515–532.

Wentzell, A. M., Rowe, H. C., Hansen, B. G., Ticconi, C., Halkier, B. A., and Kliebenstein, D. J. (2007). Linking metabolic QTLs with network and cis-eQTLs controlling biosynthetic pathways. *PLoS Genet.* 3:e162. doi: 10.1371/journal.pgen.0030162

Wiegand, R. C., Shah, D. M., Mozer, T. J., Harding, E. I., Diaz-Collier, J., Saunders, C., et al. (1986). Messenger RNA encoding a glutathione-S-transferase responsible for herbicide tolerance in maize is induced in response to safener treatment. *Plant Mol. Biol.* 7, 235–243. doi: 10.1007/BF00752897

Willett, S. W., and Copley, S. D. (1996). Identification and localization of a stable sulfenic acid in peroxide-treated tetrachlorohydroquinone dehalogenase using electrospray mass spectrometry. *Chem. Biol.* 3, 851–857. doi: 10.1016/S1074-5521(96)90071-X

Xu, J., Tian, Y.-S., Xing, X.-J., Peng, R.-H., Zhu, B., Gao, J.-J., et al. (2016). Over-expression of AtGSTU19 provides tolerance to salt, drought and methyl viologen stresses in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* 156, 164–175. doi: 10.1111/ppl.12347

Xu, J., Zheng, A.-Q., Xing, X.-J., Chen, L., Fu, X.-Y., Peng, R.-H., et al. (2018). Transgenic *Arabidopsis* plants expressing grape glutathione S-Transferase gene (VvGSTF13) show enhanced tolerance to abiotic stress. *Biochemistry* 83, 755–765. doi: 10.1134/S0006297918060135

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

Xun, L., Topp, E., and Orser, C. S. (1992). Purification and characterization of a tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase from a *Flavobacterium* sp. *J. Bacteriol.* 174, 8003–8007. doi: 10.1128/jb.174.24.8003-8007.1992

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

Yamazaki, M., Shibata, M., Nishiyama, Y., Springob, K., Kitayama, M., Shimada, N., et al. (2008). Differential gene expression profiles of red and green forms of *Perilla frutescens* leading to comprehensive identification of anthocyanin biosynthetic genes: anthocyanin biosynthetic genes from *Perilla*. *FEBS J.* 275, 3494–3502. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06496.x

Yang, G., Xu, Z., Peng, S., Sun, Y., Jia, C., and Zhai, M. (2016). In planta characterization of a tau class glutathione S-transferase gene from Juglans regia (JrGSTTau1) involved in chilling tolerance. *Plant Cell Rep.* 35, 681–692. doi: 10.1007/s00299-015-1912-8

Yang, L.-P., Fang, Y.-Y., An, C.-P., Dong, L., Zhang, Z.-H., Chen, H., et al. (2013). C2-mediated decrease in DNA methylation, accumulation of siRNAs, and increase in expression for genes involved in defense pathways in plants infected with beet severe curly top virus. *Plant J.* 73, 910–917. doi: 10.1111/tpj.12081

Yang, Q., Han, X.-M., Gu, J.-K., Liu, Y.-J., Yang, M.-J., and Zeng, Q.-Y. (2019). Functional and structural profiles of GST gene family from three *Populus* species reveal the sequence-function decoupling of orthologous genes. *New Phytol.* 221, 1060–1073. doi: 10.1111/nph.15430

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

Zettl, R., Schell, J., and Palme, K. (1994). Photoaffinity labeling of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane vesicles by 5-azido-[7-3H]indole-3-acetic acid: identification of a glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 689–693. doi: 10.1073/pnas.91.2.689

Zhao, J. (2015). Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends Plant Sci.* 20, 576–585. doi: 10.1016/j.tplants.2015.06.007

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

*Copyright © 2019 Sylvestre-Gonon, Law, Schwartz, Robe, Keech, Didierjean, Dubos, Rouhier and Hecker. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) 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.*

## D. Implication des GSTs canoniques dans le métabolisme spécialisé

Les GSTs sont souvent décrites comme des enzymes impliqués dans le métabolisme spécialisé chez les organismes produisant ces molécules (plantes, champignons et bactéries). A l'instar de certaines isoformes de GSTs fongiques et bactériennes de classes oméga ou nu qui interviennent dans le métabolisme de stilbènes ou de lignines (Kontur *et al.,* 2018; Perrot *et al.,* 2018) ; les GSTs des classes phi et tau de plantes interviennent dans l'anabolisme ou le catabolisme de nombreux métabolites spécialisés. L'action des GSTs dans ce métabolisme fait autant appel à leur activité catalytique qu'à leur propriété ligandine. Dans les paragraphes suivants, je m'attèlerai à présenter une éventuelle implication des GSTs dans le métabolisme spécialisé chez les plantes. De nombreux gènes codant des GSTs tau et phi sont surexprimés au cours du métabolisme de terpènes ou polyphénols (β-cyclocitral, anthocyanes, flavonodes, …), bien que le rôle exact de ces GSTs dans le métabolisme spécialisé reste dans la plupart des cas incertain (Lv *et al.,* 2015; Hu *et al.,* 2016; Qian *et al.,* 2018).

L'exemple le plus documenté de l'implication des GSTs dans le métabolisme spécialisé est celui des GSTUs et des GSTFs qui interviennent notamment dans le métabolisme des anthocyanes. Ces pigments vacuolaires étant synthétisés entre le réticulum endoplasmique et le cytosol (Petrussa *et al.,* 2013; Nakayama *et al.,* 2019), un transport vers la vacuole impliquant des GSTs phi et tau est nécessaire. La délétion des gènes codant ces GSTs entraine une dépigmentation de la plante (Alfenito 1998; Kitamura *et al.,* 2004; Gomez *et al.,* 2011; Momose *et al.,* 2013). L'absence de coloration n'est pas due à un défaut de synthèse des anthocyanes au niveau du réticulum endoplasmique mais à l'absence de transport de ces métabolites vers la vacuole. Ainsi, les anthocyanes sont transitoirement liés/transportés par les GSTs par le biais de leur propriété ligandine pour une présentation ultérieure aux transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) permettant leur séquestration vacuolaire. Les GSTs Bronze-2 (Bz2 une GSTU), Antocyanin9 (An9 une GSTF), Transparent testa 19 (TT19 une GSTF), Flavonoid3 (fl3), VvGST1 et VvGST4, PfGST1 et CkmGST3 de *Zea mays*, *Petunia hybrida, Arabidopsis thaliana, Dianthus caryophyllus*, *Vitis vinifera, Perilla frutens et Cyclamen spp* respectivement, sont décrites pour jouer ce rôle de protéines cargo (Marrs *et al.,* 1995; Alfenito 1998; Mueller *et al.,* 2000; Larsen *et al.,* 2003; Kitamura *et al.,* 2004; Conn *et al.,* 2008; Yamazaki *et al.,* 2008; Kitamura *et al.,* 2012). Les auteurs d'une revue générale sur le transport des flavonodes ont proposé que la liaison des anthocyanes (et précurseurs) aux GSTs les protégeraient d'une dégradation ou oxydation potentielle entre le cytosol/réticulum endoplasmique et la vacuole (Zhao 2015).

Les composés phénoliques ne sont pas les seuls métabolites spécialisés interagissant avec les GSTUs et GSTFs. En effet, des interactions entre les phytoalexines/glucosinolates et les GSTs ont été décrites dans la littérature. Des GSTs de la classe phi sont impliquées dans le métabolisme de la camaléxine. Entre autres, chez *Arabidopsis thaliana,* la GSTF6 conjugue du GSH sur l'indole-3-acétonitrile, un précurseur de la camaléxine (phytoalexine) alors que la GSTF2 de par sa fonction ligandine est capable de fixer cette molécule (Dixon *et al.,* 2011a; Su *et al.,* 2011) permettant sa séquestration et diminuant de fait sa toxicité sur la plante. En effet une concentration 100 µg/ml suffit pour induire une mort cellulaire (Glawischnig 2007). Les isothiocyanates notamment sont couramment utilisés comme substrats modèles pour vérifier l'activité de conjugaison de GSH des GSTs. Chez les plantes, les GST Phi et Tau seraient impliquées dans le métabolisme des glucosinolates. La GSTU13 d'*Arabidopsis thaliana* a été identifiée comme composant indispensable à la fonction immunitaire de l'indole glucosinolate, en effet le mutant *gstu13* n'est pas capable de synthétiser les dérivés glucosinolates impliqués dans la défense contre les pathogènes (4-O-β-D-glucosyl-indol-3-yl formamide, indole-3-ylméthyl amine, …) (Piślewska-Bednarek *et al.,* 2018).

D'autres rôles restent à ce jour peu documentés chez les plantes alors qu'ils le sont chez d'autres organismes. Il s'agit notamment de l'interaction des GSTs avec les hèmes et leurs dérivés. La capacité

des GSTs à lier des hèmes a été étudiée en premier lieu chez les mammifères. Certaines GSTs, par l'intermédiaire de leur fonction ligandine, sont en effet capables de fixer la bilirubine qui est un produit de dégradation des hémoprotéines chez l'Homme (Levi et Arias 1969; Ketterer *et al.,* 1974). Cette propriété des GSTs à interagir avec les hèmes a également été étudiée chez les plantes notamment avec les GSTUs de *Zea mays* et d'*Arabidopsis thaliana* (Lederer et Böger 2003; 2005; Dixon *et al.,* 2008; Dixon et Edwards 2018). Bien que l'interaction des hèmes avec les GSTs ait été observée, la pertinence physiologique d'une telle interaction reste à démontrer bien qu'il soit suggéré que ces GSTs pourraient intervenir dans le transport inter-organites des hèmes (Larkin 2016). Ces différents aspects ont été abordés dans un article hybride (revue/résultat) qui sera présenté dans la partie résultat de ce manuscrit (article 2, (Sylvestre-Gonon *et al.,* 2020)). Cet article souligne la capacité d'une isoforme de GSTU d'*Arabidopsis thaliana* à lier la protoporphyrin IX (PPIX) qui est un précurseur des tétrapyrroles. De plus, la fixation de la PPIX par les GSTs suggère que ces dernières pourraient également lier des molécules de chlorophylles. Du fait de l'incertitude persistante quant à la nature des transporteurs/protéines cargo en charge du transport des produits du catabolisme des chlorophylles vers la vacuole, les GSTs pourraient ainsi réaliser au travers de leur fonction ligandine le transfert de ces molécules du cytosol vers ou depuis un organite.

Le dernier rôle potentiel des GSTs dans le métabolisme spécialisé est celui relatif au métabolisme des coumarines. En effet, bien que la voie de biosynthèse de certaines coumarines soit bien connue, quelques points concernant leur localisation tissulaire/cellulaire doivent encore être éclaircis (Robe *et al.,* non publié). Comme d'autres composés phénoliques, les coumarines peuvent s'avérer toxiques lorsqu'elles sont accumulées dans la cellule (Pan *et al.,* 2011). Ces molécules doivent être stockées dans la vacuole pour neutraliser leur toxicité. De nombreux indices suggèrent l'implication des GSTs dans ce mécanisme. La caractérisation de ces GSTs et la confirmation de leur rôle dans ce processus sont un des enjeux de ma thèse et seront présentés dans la suite de ce manuscrit.

# Problématique de recherche et objectifs de thèse

# *Problématique de recherche et objectifs de thèse*

## A. Contexte et objectifs

Les GSTs sont impliquées dans de nombreuses fonctions aussi bien chez les plantes que chez les autres organismes vivants. Pour rappel, certaines d'entre-elles sont impliquées dans la détoxication des xénobiotiques, interviennent dans la régénération de l'ascorbate (Dixon *et al.,* 2002a; Lallement *et al.,* 2016), la synthèse ou encore le transport de métabolites spécialisés (Dixon et Edwards 2010b; Dixon *et al.,* 2011a; Lallement *et al.,* 2014b). Les GSTs des classes phi et tau sont impliquées dans la résistance à de nombreux stress biotiques et abiotiques tels que le stress hydrique, oxydant, salin ou ceux liés à une infection par un pathogène (Lieberherr *et al.,* 2003; Sharma *et al.,* 2014; Skopelitou *et al.,* 2015; Kao *et al.,* 2016; Yang *et al.,* 2016). Malgré leur implication dans ces nombreux processus cellulaires, le ou les rôle(s) physiologique(s) de la plupart des GSTs restent, à ce jour, incertain(s) voire inconnu(s).

Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe réponse aux stress et régulation redox du laboratoire Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) de l'UMR 1136 INRAE-Université de Lorraine. Dans le cadre d'un projet global de compréhension de l'adaptation des plantes et champignons décomposeurs à leurs contraintes environnementales, cette équipe de recherche étudie depuis de nombreuses années les GSTs. Mes travaux ont ainsi été entrepris dans le souci d'une meilleure compréhension des rôles et fonctions des GSTs de la classe tau, la classe la plus représentée chez les plantes.

Mon projet de caractérisation des GSTUs a été abordé selon deux axes principaux de recherche :

- ✓ l'un faisant suite à une collaboration dans le cadre d'un projet ANR sur la compréhension de la dynamique de la sécrétion des coumarines dans le sol par les plantes pour améliorer la nutrition en fer dans le cadre du projet ANR MOBIFER piloté par Christian Dubos (Montpellier).
- ✓ le second entrant dans une thématique propre au laboratoire sur l'étude des GSTs de peuplier.

### 1. Les GSTUs interviendraient dans le métabolisme des coumarines

Le projet MOBIFER porte sur l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le prélèvement, l'assimilation et le stockage du fer chez *Arabidopsis thaliana*, travaux développés dans l'équipe Nutrition Minérale et Stress Oxydatif (FeROS) dirigée par Christian Dubos au sein de l'UMR Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (BPMP) de Montpellier. En plus de cette équipe, ce projet implique notre équipe ainsi que l'équipe dirigée par Sébastien Thomine au sein de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC, Université Paris-Saclay).

Le fer est un micronutriment essentiel à la croissance et au développement des plantes. Bien qu'il soit l'un des éléments les plus abondants du sol, il est généralement peu disponible pour les plantes parce qu'il se présente principalement sous la forme de chélates ferriques insolubles. Chez les plantes non graminées et notamment chez *Arabidopsis thaliana*, la nutrition en fer repose sur l'acidification de la rhizosphère et la chélation du fer par les coumarines (figure 12) (Brumbarova *et al.,* 2015). Une perte d'activité du transporteur responsable de la sécrétion des coumarines (PDR9) conduit à une accumulation de ces dernières dans les racines (Fourcroy *et al.,* 2014; 2016). Afin d'identifier les acteurs moléculaires responsables de l'accumulation des coumarines dans les racines, une analyse de l'expression des gènes à grande échelle a été réalisée sur des racines d'*Arabidopsis* et du mutant *pdr9* au cours d'une carence en fer. Parmi les gènes régulés, certains codent des protéines potentiellement impliquées dans la compartimentation de coumarines. Il s'agit essentiellement de transporteurs ABC

de type MATE (Multidrug And Toxin Extrusion) ou MRP (Multidrug Resistance-associated Protein) et de GSTs de la classe Tau (GSTU), des familles impliquées dans la séquestration vacuolaire de métabolites spécialisés (Marinova *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que des couples transporteurs ABC/GSTUs pourraient participer au maintien de l'intégrité cellulaire en évitant la suraccumulation de coumarines qui pourrait s'avérer toxique dans le cytoplasme.

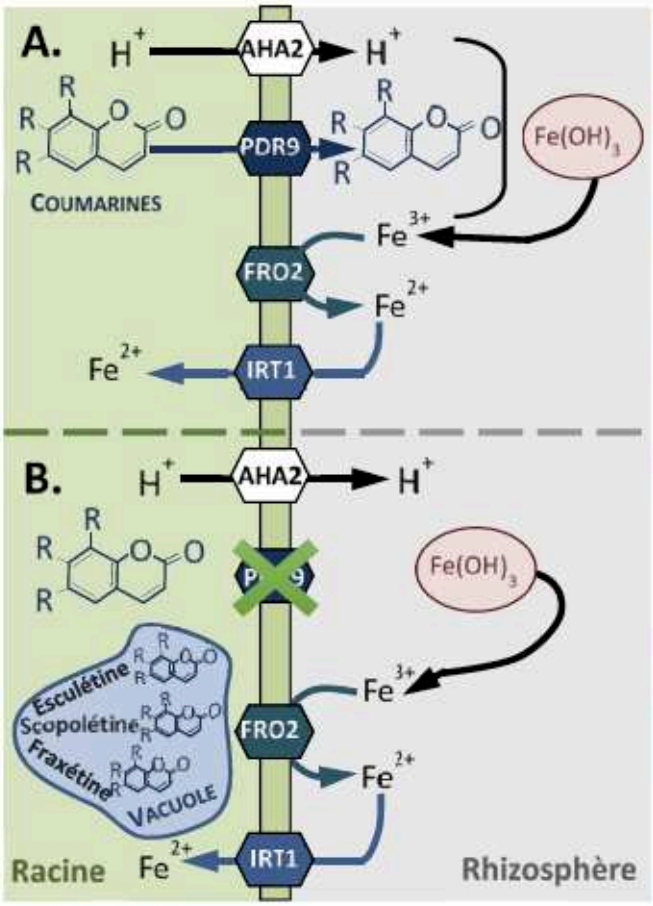



**Figure 12 : Stratégie de mobilisation du fer employée par *Arabidopsis thaliana* (Adaptée de Fourcroy *et al.*, 2016).** Chez les plantes non graminées, la solubilisation du fer dans les sols calcaires est basée sur la réduction du fer. Après acidification de la rhizosphère par la pompe à proton AHA2, l'oxydoréductase FRO2 réduit le fer ferrique ($Fe^{3+}$) en fer ferreux ($Fe^{2+}$), ce dernier est ensuite internalisé au sein de la racine par le transporteur membranaire IRT1 (Iron-Regulated Transporter 1). En parallèle, la solubilisation du fer ferrique est facilitée par la sécrétion de coumarines dans la rhizosphère par l'intermédiaire du transporteur PDR9 (Pleiotropic Drug Resistance 9/ABC transporter G37), un transporteur de type ABC (ATP Binding Cassette) **(A)**. Chez *A. thaliana*, un mutant d'insertion pour le gène pdr9 a montré une accumulation importante des coumarines scopolétine, esculétine, sidérétine et fraxétine dans les vacuoles racinaires en condition de carence en fer **(B)**.

Dans ce contexte, mon travail de thèse avait pour objectif de produire, de purifier puis de caractériser biochimiquement les GSTUs potentiellement impliquées dans le trafic et/ou le stockage vacuolaire de coumarines dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*. Dans un second temps, je devais isoler et identifier les molécules interagissant avec ces GSTUs puis caractériser finement ces interactions moléculaires.

## 2. Caractérisation des GSTUs de peuplier

Le second axe de recherche de ma thèse s'inscrit dans une suite logique des travaux entrepris depuis plusieurs années au sein de l'équipe Réponse aux stress et régulation redox. Ces travaux portent sur la caractérisation « structure-fonction » des GSTs chez les plantes avec l'arbre modèle *Populus trichocarpa* ou encore chez les champignons décomposeurs de bois (*Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor*). Indépendamment de son intérêt en physiologie végétale, du fait de sa croissance rapide et de la taille de son génome (423 millions de paires de bases, 50 fois inférieur à celui du pin (Tuskan *et al.*, 2006; Phytozome V13), le peuplier présente un intérêt économique. Son bois est notamment valorisé en pâte à papier, ou la confection d'emballages légers ou de supports de transports tels que cagettes ou palettes. Cet arbre, cultivé en Europe dans des peupleraies est régulièrement infecté par le champignon pathogène *Melampsora larici-populina* à l'origine de la rouille du peuplier, maladie entrainant une défoliation précoce induisant au fil des années une baisse

importante de la production de bois. Au sein de notre laboratoire, un projet inter-équipe/multidisciplinaire vise à comprendre les mécanismes moléculaires intervenant dans la colonisation du peuplier par *M. larici-populina*. Une analyse transcriptomique des feuilles de peuplier a révélé que des gènes codant des GSTUs sont surexprimés lors d'une infection par le champignon phytopathogène biotrophe *Melampsora larici-populina*. Il s'agit notamment de gènes codant les GSTUs 19, 20, 27, 30, 46 et 52 (Rinaldi *et al.,* 2007). Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté en la caractérisation des GSTUs potentiellement impliquées dans la réponse du peuplier à *Melampsora larici-populina* aussi bien d'un point de vue biochimique (catalytique ou interactionnel) que structural.

## B. Démarche scientifique

Qu'elles soient issues d'*Arabidopsis thaliana* ou de *Populus trichocarpa*, les GSTUs d'intérêt ont été caractérisées biochimiquement et structuralement selon une stratégie expérimentale commune schématisée en figure 13.

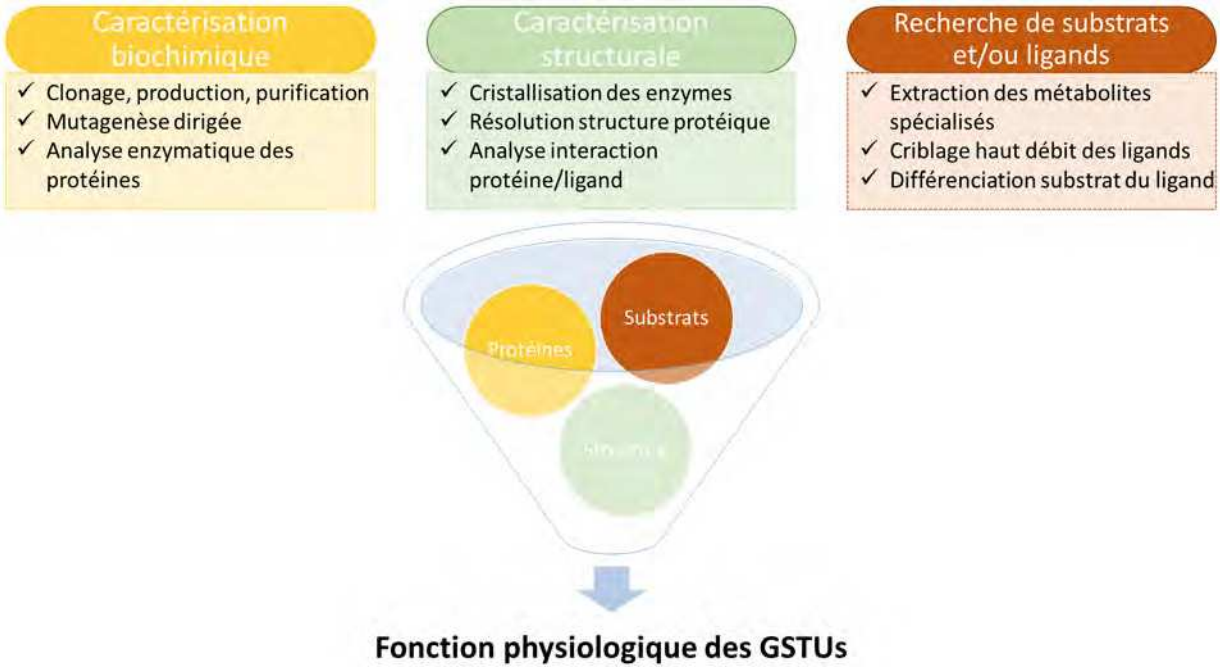



**Figure 13:**

Dans un premier temps, les protéines ont été produites à l'aide d'un système d'expression hétérologue bactérien (*E. coli*) puis purifiées à homogénéité par différentes étapes de chromatographies. Les protéines recombinantes purifiées ont ensuite été caractérisées biochimiquement au travers de tests enzymatiques variés et structuralement grce à une collaboration entretenue de longue date avec l'équipe BioMod dirigée par Claude Didierjean de l'UMR Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM²) qui étudie les relations structure-fonction des biomolécules. En parallèle des métabolites spécialisés ont été extraits à la fois d'arabette et de peuplier dans le but d'analyser, par les techniques de dénaturation thermique par fluorescence et compétition avec des substrats modèles, leur interaction potentielle avec les protéines recombinantes purifiées. Afin de faciliter la lecture de ce manuscrit et d'éviter toutes redondances, les principaux résultats obtenus au cours de ma thèse seront présentés selon la stratégie expérimentale, caractérisation biochimique d'une part puis structurale et enfin recherche de substrat/ligand et non en termes d'organismes ou de projet.

# Matériel et méthodes

# *Matériel et méthodes*

## Chapitre I : Méthodes relatives au clonage de séquences codant les GSTUs

### A. Construction des vecteurs d'expression

Les séquences codant les protéines AtGSTU1, 6, 7, 8, 16, 19, 22, 24, 25 ont été amplifiées par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir d'ADNc obtenus par rétro-transcription d'ARNm issus d'extraits de feuilles ou de racines d'*A. thaliana* et d'un couple d'amorces sens comprenant un site de restriction *Nco*I (ou *Nde*I selon le cas) et anti-sens contenant un site de restriction *Xho*I (ou *Bbs*I compatible avec *Xho*I selon le cas). Les différents couples d'amorces utilisés lors cette thèse sont présentés en annexes (Tableau A2). Les sites de restriction ajoutés par PCR sont compatibles avec les vecteurs d'expression pET26b ou pET28a (Novagen) utilisés. L'amplification a été réalisée dans un volume de 50 µl dans le tampon de réaction fourni supplémenté par 1,5 mM de $MgCl_2$ ; 200 µM de chaque dNTP ; 10 ng d'ADNc matrice ; 0,5 µM de chaque oligonucléotide sens et anti-sens et 0,5 unités de polymérase iProof™ High Fidelity (Bio-Rad). Après une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, l'ADNc est soumis à un cycle d'amplification de 35 cycles chacun constitué d'une étape de dénaturation de l'ADN matrice pendant 45 secondes à 95°C, d'une étape d'hybridation des oligonucléotides spécifiques du gène cible pendant 1 minute à 52°C et enfin une étape de polymérisation de l'ADN pendant 1 minute à 72 °C (vitesse de l'ordre de 30 sec/kb). L'amplification a été terminée par une étape d'extension terminale de 5 minutes à 72°C. Les amplicons ainsi obtenus ont alors été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant 0,05% de bromure d'éthidium (molécule intercalante) dans du tampon TBE 1X (Tris 82 mM, borate 45 mM ; EDTA 1 mM). Les fragments amplifiés ont été visualisés sous UV puis purifiés à l'aide du kit d'extraction sur gel Illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) selon les recommandations du fournisseur. Les fragments d'ADN ont alors été digérés 1 heure à 37°C par les enzymes de restriction adéquates puis à nouveau purifiés. Les inserts digérés et purifiés ont été ligaturés à 50 ng de vecteur plasmidique pET-26b ou pET-28a, préalablement digérés par les enzymes de restriction *Nde*I (ou *Nco*I) et *Xho*I, selon un rapport insert/vecteur de 3/1. Les réactions de ligature ont été réalisées dans un volume de 20 µL contenant 40 mM de Tris-HCl pH 7,5 ; 10 mM de $MgCl_2$ ; 10 mM de DTT ; 0,5 mM d'ATP et 1 U Weiss d'ADN polymérase du phage T4 (Fermentas) pendant 16 heures à 4°C.

Les plasmides d'expression dans lesquels ont été insérées les séquences codant les GSTU19, 20, 27, 30, 46 et 52 de peuplier étudiées au cours de cette thèse ont été obtenus préalablement à mon arrivée au laboratoire. Ces séquences ont été amplifiées à partir d'ADNc préparés à partir d'ARN totaux issus de feuilles ou de fleurs de peuplier (*Populus trichocarpa* ou cultivar Beaupré *P. trichocarpa* x *P. deltoides*) puis clonées dans le plasmide pET12a entre les sites de restriction *Nco*I et *Bam*HI.

### B. Les étapes de transformation bactérienne

La transformation bactérienne consiste en la modification du patrimoine génétique d'une cellule bactérienne par introduction d'une information génétique exogène. Les produits de ligature (7 µl) ont été ajoutés à 50 µl de cellules chimiocompétentes (souches DH5α et Rosetta2 (DE3) pLysS respectivement dédiées aux étapes de clonage et à l'expression de protéines recombinantes) ou

électrocompétentes (souche BL21 (DE3) pSBET dédiée à l'expression de protéines recombinantes) dont les caractéristiques (génotype, résistance, utilisation) sont présentées en annexes (Tableau A3). Après incubation 30 min. sur de la glace pilée, l'ensemble a subi en fonction de la nature de la compétence de la souche utilisée un choc thermique de 45 sec à 42°C ou un choc électrique (2800 V, 5 msec) provoquant l'entrée de l'ADN dans les cellules. Le mélange a ensuite été additionné de 500 µl de milieu liquide de Luria-Bertani et incubé 1 h à 37°C sous agitation à 150 tours/min. Cette étape de régénération permet aux bactéries de reconstituer leur paroi et d'exprimer la résistance portée par le plasmide recombinant. Les bactéries ont alors été étalées à la surface de LB gélosé complémenté par les antibiotiques adéquats (Annexes tableau A3) et incubées une nuit à 37°C.

### C. Sélection des clones recombinants par PCR sur colonie

Afin de sélectionner des colonies transformées par un plasmide recombinant (plasmide dans lequel a été insérée la séquence codant la protéine d'intérêt), une colonie bactérienne a été prélevée sur une boite de Petri puis ajoutée à une solution (25 µL) contenant 1,5 mM de $MgCl_2$ ; 200 µM de chaque dNTP ; 0,5 µM d'oligonucléotides sens et anti-sens spécifiques du gène d'intérêt (oligonucléotides identiques à ceux utilisés pour le clonage) et 0,4 unités de polymérase Go-Taq (Promega). Le protocole utilisé pour réaliser la réaction d'amplification par PCR est identique à celui employé lors de l'étape de construction du vecteur d'expression. Les produits d'amplification obtenus ont alors été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans du tampon TBE 1X. Après mise en culture une nuit dans 3 ml de milieu LB des colonies jugées positives par la techniques de PCR sur colonie, les plasmides recombinants ont alors été extraits par la technique de « lyse alcaline » (Birnboim et Doly 1979) à l'aide du kit Illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) selon les recommandations du fournisseur. La présence d'un insert a alors été vérifiée par restriction et électrophorèse sur gel d'agarose 1% et l'absence de mutation par séquençage (Genewiz).

## Chapitre II: Méthodes relatives à l'expression, la production et la purification de protéines recombinantes

### A. Production des GSTUs d'*Arabidopsis thaliana* et de *Populus trichocarpa*

Une colonie de la souche d'expression Rosetta2 (DE3) pLysS ou BL21 (DE3) pSBET préalablement transformée avec le plasmide d'intérêt (voir tableau A4 annexes) a été mise en culture dans 3 ml de milieu LB en présence de 50 µg/ml de kanamycine et de 34 µg/ml de chloramphénicol ou 50 µg/ml d'ampicilline (en fonction de la souche utilisée) à 37°C sur la journée. Le volume de culture a été successivement augmenté à 200 ml sur la nuit puis à 2 litres le lendemain matin toujours sous pression de sélection en présence des antibiotiques. Lorsque la culture bactérienne s'est trouvée en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm}$ comprise entre 0,7 et 0,8), l'expression de la protéine recombinante a été induite pendant 6 h à 37°C par ajout de 100 µM d'IPTG dans le milieu de culture. Dans le cas où la protéine est majoritairement retrouvée dans la fraction bactérienne insoluble, le milieu de culture a été additionné de 0,5% d'éthanol lorsque la culture atteint une $DO_{600nm}$ de 0,8 puis placé 2 heures à 4°C. L'expression de la protéine recombinante a été alors induite pendant 16 h à 20°C après ajout de 100 µM d'IPTG dans le milieu de culture afin d'augmenter la solubilité de la protéine recombinante produite. Après induction, les cellules sont récoltées par centrifugation à 6000 g

pendant 15 minutes puis resuspendues dans un volume final de 20 ml de tampon Tris-HCl 30 mM pH 8, 200 mM de NaCl et conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

## B. Purification des protéines recombinantes

La présence ou non d'une étiquette poly-histidine en position C-terminale conditionne le type de purification utilisé pour obtenir les protéines recombinantes. Ainsi les protéines GSTUs d'*Arabidopsis thaliana* qui possèdent toutes cette étiquette, ont été purifiées selon un protocole couplant une chromatographie d'affinité sur résine saturée en ions nickel (Ni-NTA) à une chromatographie d'exclusion stérique. Cette dernière permet d'éliminer à la fois les dernières traces de contaminants protéiques bactériens et l'imidazole nécessaire à l'élution de la protéine recombinante lors de la première étape de purification. Les protéines recombinantes (GSTUs de *Populus trichocarpa*) dépourvues non étiquetées, ont été purifiées selon un protocole combinant une chromatographie d'exclusion stérique (gel Ultrogel® AcA 44) à une chromatographie échangeuse d'ions sur résine anionique de type diéthylaminoéthyle (DEAE)-Sepharose permettant de séparer les protéines en fonction de leur charge.

### 1. Purification des protéines étiquetées

Après décongélation, la lyse des cellules a été achevée par sonication à 4°C (cycle de deux fois 1 minute à une amplitude de 20%). Les débris bactériens ainsi que les protéines agrégées ont été éliminés par centrifugation à 48000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines bactériennes solubles a alors été chargé sur une colonne contenant une résine de type Ni-NTA agarose (Qiagen) préalablement équilibrée avec du tampon de lyse (Tris-HCl 30 mM pH 8, NaCl 200 mM). La résine a ensuite été lavée par du tampon de lyse supplémenté par 20 mM d'imidazole puis la protéine recombinante éluée par le même tampon mais supplémenté par 250 mM d'imidazole. Les fractions d'élution contenant la protéine recombinante ont été regroupées, concentrées puis injectées sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille de type HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec du tampon de lyse et couplée à un système automatisé (FPLC) Aktä Purifier (GE Healthcare). Les fractions contenant la protéine recombinante d'intérêt ont alors été rassemblées puis concentrées. L'homogénéité et la pureté de l'échantillon obtenu ont été analysées par électrophorèse dénaturante réductrice de type SDS-PAGE (gels 15% - composition en annexes tableau A5) et la concentration protéique déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm à l'aide de l'équation de Beer-Lambert : $A = \varepsilon . c . l$ où A correspond à l'absorbance (sans unité de mesure), ε au coefficient d'extinction molaire (en $mol^{-1}.L.cm^{-1}$), c à la concentration protéique (en $mol.L^{-1}$) et enfin l à la longueur (en cm) du trajet optique dans la cuvette de mesure. Le coefficient d'extinction molaire spécifique théorique de chaque protéine purifiée a été déterminé à partir de sa séquence primaire à l'adresse suivante : http://web.expasy.org/protparam. Chaque protéine recombinante purifiée est conservée à -20°C dans un tampon identique à celui utilisé pour la lyse, éventuellement supplémenté avec 50% de glycérol lorsque les protéines ne supportaient pas la congélation.

### 2. Purification des protéines non étiquetées

Dans le cas de la purification des protéines recombinantes non étiquetées, le surnageant contenant les protéines bactériennes solubles obtenu après lyse cellulaire et centrifugation (voir § précédent) a été précipité à 40 % (m/v) de sulfate d'ammonium. Après centrifugation à 48000 g pendant 20 minutes à 4°C, le surnageant a alors été précipité à 80% (m/v) de sulfate d'ammonium puis à nouveau centrifugé à 48000 g pendant 20 minutes à 4°C. La fraction contenant la protéine d'intérêt a été sélectionnée par

analyse des différentes fractions obtenues par électrophorèse dénaturante réductrice sur gel d'acrylamide de type SDS-PAGE puis chargée sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille contenant une résine de type acrylamide-agarose (ACA) 44 (Ultrogel® AcA 44, Pall-BioSepra) ayant un domaine de fractionnement de 10 à 130 kDa. La résine de type ACA44 a été préalablement équilibrée avec du tampon de lyse (Tris-HCl 30 mM pH 8, NaCl 200 mM). Les fractions d'élution contenant la protéine recombinante sont regroupées, concentrées puis séparées par une chromatographie d'échange d'anions sur résine DEAE couplée à une pompe péristaltique et préalablement équilibrée avec du tampon Tris-HCl 30 mM pH 8. L'élution a été réalisée au travers d'un gradient salin permettant un passage de 0 à 0,4 M de NaCl dans du Tris-HCl 30 mM pH 8,0. Les fractions contenant la protéine recombinante d'intérêt sont rassemblées puis concentrées. L'homogénéité et la pureté de l'échantillon obtenu sont déterminées par électrophorèse dénaturante réductrice sur gel de type SDS-PAGE et la concentration protéique est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm à l'aide de l'équation de Beer-Lambert. Chaque protéine recombinante purifiée est conservée à -20°C dans un tampon identique à celui utilisé pour la lyse.

# ChapitreIII : Méthodes relatives à la caractérisation biochimique etstructurale des protéines recombinantes purifiées

## A. Caractérisation biochimique

### 1. Mesure des activités enzymatiques à l'aide du spectrophotomètre

Les activités des GSTs produites et purifiées sous la forme de protéines recombinantes peuvent être suivies par mesures spectrophotométriques directes ou indirectes dans le cas de l'utilisation d'un système couplé. La mesure d'activité de conjugaison de GSH a été effectuée à 25°C par suivi de l'absorbance à 224, à 274, à 340 et à 412 nm pour le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), les phénétyl et benzyl-isothiocyanates (PITC et BITC), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) et 4-nitrophenyl-butyrate (PNP-butyrate) respectivement. Les réactions se déroulent dans un volume réactionnel de 500 µL de tampon phosphate 100 mM pH 6,5 pour les isothiocyanates et le HNE, tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,5 pour le PNP-butyrate et tampon Tris-HCl 30 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pour le CDNB. Des concentrations variables de HNE (6,25-175 µM), PITC (2,5-1000 µM), BITC (5-900 µM), CDNB (2,5-10000 µM), PNP-butyrate (25-3000 µM) et une concentration fixe de GSH de 1 mM ont été utilisées. Dans le cas particulier du HNE, une concentration fixe de GSH de 0,7 mM a été employée afin de réduire les interférences à 224 nm. Les activités thiol-transférase et réduction des peroxydes ont été mesurées contre les substrats 2-hydroxyéthyl disulfide (HED) et cumène hydroperoxyde (CuOOH) ou tert-butyl hydroperoxyde (t-BOOH) respectivement à l'aide du système couplé au NADPH. Les mesures ont été réalisées à 25°C par suivi spectrophotométrique à 340 nm. Les réactions se déroulent dans un volume réactionnel de 500 µL de tampon Tris-HCl 30 mM pH 8,0, EDTA 1 mM contenant 150µM NADPH, 0,5 unités de glutathion réductase extraite de levures, des concentrations variables CuOOH (12,5-4000 µM) et fixes de 1 mM de HED, t-BOOH et GSH.

Quel que soit le type d'activité mesurée, les réactions sont initiées par l'ajout d'enzyme à une concentration générant une réponse linéaire. La vitesse initiale de réaction a été déterminée en retranchant la vitesse de réaction spontanée non enzymatique à la pente mesurée après ajout d'enzyme. Pour chaque concentration de substrat, trois répétitions indépendantes ont été réalisées. Les paramètres cinétiques ($k_{cat}$, $K_M$, $k_{cat}/K_M$) ont été déterminés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6

par corrélation des données avec le modèle non-linéaire de Michaelis-Menten en utilisant un coefficient d'extinction molaire spécifique de 13750 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 224 nm pour le HNE, 8890 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 274 nm pour le PITC, 9250 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 274 nm pour le BITC, 9600 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 340 nm pour le CDNB, 17700 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 412 nm pour le PNP-butyrate et 6220 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 340 nm pour le NADPH.

### 2. Analyse des interactions par dénaturation thermique par fluorescence

La technique de dénaturation thermique par fluorescence (fluorescent-based ThermalShift Assay), également appelée fluorimétrie à balayage différentiel, repose sur le principe que la fixation d'un ligand sur une protéine cible peut entrainer une stabilisation ou une déstabilisation de l'état natif de cette dernière. Cette modification de l'état natif d'une protéine se traduit respectivement par une augmentation ou une diminution de sa température de fusion ($T_m$) et peut être mesurée à l'aide de SYPRO Orange. Le SYPRO Orange est une molécule qui lorsqu'elle se trouve dans un environnement hydrophobe ou qu'elle se lie à une surface hydrophobe d'une protéine par exemple émet de la fluorescence. Lorsqu'une protéine est chauffée de façon continue de 5 à 95°C par exemple, les surfaces hydrophobes de cette dernière sont alors progressivement exposées entrainant à la fois une fixation progressive de la sonde et une augmentation de la fluorescence après exclusion d'eau.
Au-delà d'une certaine température (spécifique à la protéine), la protéine est totalement dénaturée et les molécules de SYPRO Orange ne peuvent plus se lier à des zones hydrophobes entrainant une diminution drastique de la fluorescence émise par le Sypro® Orange (dissociation). Les expériences de dénaturation thermique par fluorescence ont été menées dans un volume final de 25 µL en présence de Tris-HCl 30 mM pH 8,0, de Sypro® Orange (Sigma-Aldrich) 5X, de 10 à 40 µM de GSTUs purifiées et de 2 µl de substrat/ligand (concentration finale de 100 µM ou 0,8 mg/ml en fonction des molécules). La concentration protéique utilisée est celle pour laquelle la différence d'intensité de fluorescence entre les valeurs minimale et maximale (ΔRFU, Relative Fluorescence Unit) est égale à 1000. Les mélanges réactionnels ont été soumis à un chauffage de 5°C à 95°C au rythme de 1°C/minute. L'émission de fluorescence a été enregistrée à l'aide d'un appareil de PCR en temps réel (CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad). Après avoir retranché le bruit de fond (fluorescence due au marqueur fluorescent seul), les valeurs de fluorescence obtenues pour chaque essai ont été normalisées par rapport aux valeurs minimale et maximale de fluorescence. La valeur du point d'inflexion de la courbe obtenue, valeur correspondant à la température de fusion de la protéine, a été déterminée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 paramétré selon le modèle sigmoïdal de Boltzmann. La température de fusion ($T_f$ ou $T_m$ pour melting temperature) correspond à la température pour laquelle 50 % de la protéine est dénaturée. Pour chaque essai, la température de fusion ainsi déterminée a été comparée à la température de fusion de la protéine étudiée incubée en absence de molécule ou d'extrait.

### 3. Inhibition de l'activité de conjugaison de GSH des GSTUs

Les tests d'inhibition de l'activité de conjugaison de GSH contre le BITC en présence de différentes molécules permettent d'étudier une interaction entre les molécules inhibitrices et les GSTs. Ces tests de compétition entre le BITC et les potentiels inhibiteurs (baïcaléine, …) ont été réalisés dans un volume réactionnel de 500 µL de tampon phosphate 100 mM pH 6,4 en présence de concentrations croissantes de BITC (5-900 µM), d'une concentration fixe de GSH (1 mM) et d'inhibiteur (0 ; 1,5 ; 3 ou 15 µM). Les mesures ont été effectuées dans les mêmes conditions expérimentales que pour le test BITC (voir paragraphe ci-dessus) à la différence que la molécule inhibitrice (volume fixe de 3 µL) et le substrat ont été ajoutés simultanément. La constante d'inhibition ($K_i$) a été déterminée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 par corrélation des données avec le modèle non-linéaire du modèle d'inhibition mixte.

## B. Caractérisation structurale

La caractérisation des structures tridimensionnelles des GSTUs d'*Arabidopsis thaliana* et *Populus trichocarpa* par diffraction des rayons X a été réalisée en étroite collaboration avec l'équipe BioMod (Claude Didierjean) du laboratoire Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM²). Cette caractérisation structurale a nécessité l'obtention de protéines recombinantes purifiées à homogénéité en quantité suffisante (de l'ordre de quelques milligrammes) pour des essais de cristallogenèse. Cette étape consiste à cristalliser la protéine en présence d'agents précipitants appropriés. Après obtention de cristaux, ces derniers ont été exposés à un faisceau de rayons X afin d'obtenir des jeux de données de diffraction. Ces derniers ont été traités informatiquement pour conduire à l'obtention de cartes de densité électronique et enfin à la modélisation de la structure tridimensionnelle de la protéine étudiée. Afin de générer les cristaux, nos collaborateurs ont employés les méthodes du (micro)batch et de diffusion de vapeur dont le principe est illustré en figure 14. La méthode cross-seeding ou d'ensemencement, employée lors de l'optimisation de cristaux, consiste à ajouter un stock de germes microcristallins (cristaux protéiques broyés impropres à une mesure de diffraction) d'un variant de la protéine ou d'une protéine homologue à la solution de cristallisation. Les différents essais de cristallogenèse ont été réalisés à la main ou à l'aide d'un robot de pipetage Oryx8 (Douglas Instruments), permettant d'utiliser un volume moindre de solution protéique (gouttes de 100 nL contre 1 µL en mode manuel) et d'augmenter la reproductibilité des expériences.

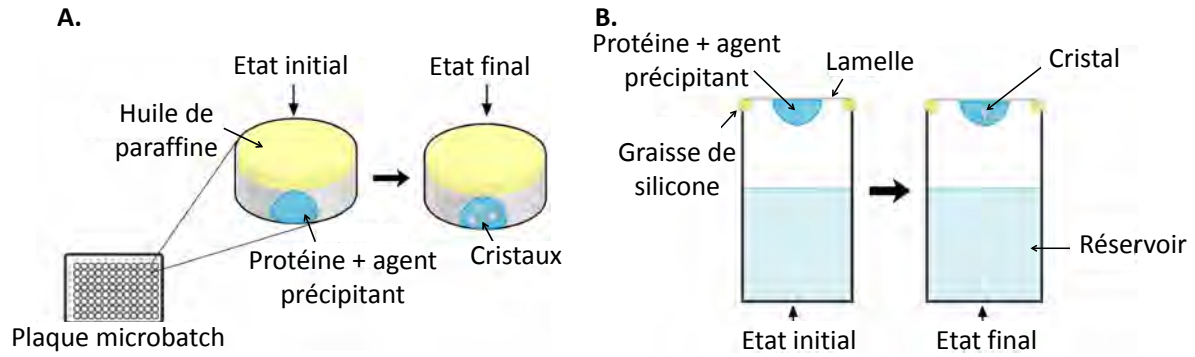



**Figure 14: otéiques.**

La méthode du batch (A) consiste à mettre en contact la solution protéique et l'agent précipitant (solution de cristallisation) au fond d'un puit clos par ajout de goutte d'huile de paraffine, dans ce système la concentration en protéine diminue au cours de l'assemblage des molécules de protéines alors que la concentration en agent précipitant reste constante. A l'inverse, dans la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendue (B), les concentrations en protéine et en précipitant varient au cours du temps. Une solution concentrée en précipitant est placée dans un réservoir qui est hermétiquement fermé par une lamelle en présence de graisse de silicone. Sur cette lamelle (face au réservoir) est déposé un mélange équivolumique de protéine et de précipitant dilué (goutte). La différence de concentration entre la goutte et le réservoir engendrera des échanges de vapeurs entre ces deux compartiments. Cette diffusion perdurera jusqu'à ce que les concentrations en précipitant au sein de la goutte et dans le réservoir soient égales.

# Résultats

# *Résultats*

Pour rappel mes travaux de thèse ont consisté en la caractérisation biochimique et structurale de quelques GSTs de la classe tau à la fois chez *A. thaliana* et *P. trichocarpa*, organismes modèles de l'unité ainsi qu'en la recherche de leur substrat/ligand. Cette étude a concerné les protéines GSTU1, 6, 7, 8, 19, 22 et 24 (code AGI en annexe tableau A9 dont les gènes sont surexprimés chez des arabettes n'exprimant pas le transporteur ABCG37/PDR9 (transporteur contribuant principalement à l'exsudation racinaire de coumarines hautement oxygénées) et soumises à une carence en fer (Annexes figure A1) (thèse de Nicolas Tissot, 2016) ainsi que les protéines GSTU19, 20, 27, 30, 46 et 52 dont les gènes sont surexprimés chez le peuplier lors d'une infection causée par le champignon phytopathogène biotrophe *Melampsora larici-populina* (Rinaldi *et al.*, 2007). Les résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse sont détaillés dans les trois chapitres qui suivent.

## (*A. thaliana* (*P. trichocarpa*

La caractérisation des GSTUs d'*A. thaliana* et de *P. trichocarpa* a débuté par une analyse phylogénétique. Les protéines d'intérêt ont ensuite été produites en système hétérologue bactérien puis purifiées selon deux stratégies différentes selon qu'elles possèdent ou non une étiquette poly-histidine. Cette analyse biochimique s'est poursuivie par l'étude des paramètres cinétiques à l'état stationnaire des différentes protéines.

### A. Spécification phylogénétique et expression

L'étude phylogénétique des 28 GSTUs d'*A. thaliana* a montré que ces dernières s'organisaient en trois clades distincts. Le clade I contient les GSTUs 1 à 10, le clade II les GSTUs 11 à 18 et le clade III les GSTUs 19 à 28 (Figure 15A). La sérine conservée se trouve en position 16 (numérotation d'AtGSTU1) au sein du motif catalytique relativement conservé SP(/M)[F(/Y)G(/S). Au sein d'un clade, l'identité de séquence est comprise entre 35 et 80 % alors qu'entre clades, elle est de l'ordre de 25 à 45 % (Figure 16A). 58 gènes codant des GSTUs ont été dénombrés lors de la première annotation du génome de peuplier (version 1.1), puis 54 suite à la réannotation du génome (version 3.1) (Tableau 2). Les 54 GSTUs de peuplier (Tableau 2) s'organisent, quant à elles, en quatre clades indépendants (Figures 15B et 16B). Les clades I, II, III et IV comptent respectivement 17, 12, 13 et 12 isoformes (Figure 15B). En termes d'identité de séquences, celle-ci est comprise entre 35 et 100 % au sein d'un clade et de 25 à 65 % entre clades (Figure 16B). Dans le cas des GSTUs de peuplier, la sérine conservée se situe en position 11 (numérotation de Potri.001G436500) au sein du motif catalytique relativement conservé du type SPFX (Figure 15B). L'analyse des profils d'expression transcriptionnelle a révélé que les gènes AtGSTU1, 6, 7, 8, 16, 19, 22, 24 et 25 sont principalement exprimés dans les racines d'arabidopsis (Arabidopsis eFP Browser, (Winter et al. 2007)). Ces analyses nous ont amenés à incorporer deux autres GSTUs d'*A. thaliana* dans notre étude afin de vérifier notamment une potentielle spécificité d'interaction des protéines AtGSTUs régulées chez le mutant *pdr9-2* avec les coumarines. Notre choix s'est tout d'abord porté sur la protéine AtGSTU16 qui est une isoforme exprimée dans les feuilles et appartenant à un clade phylogénétique différent (clade II) et sur la protéine AtGSTU25 qui est une isoforme racinaire régulée lors d'une carence en fer chez la plante sauvage (Col-0) (Lan *et al.*, 2011). Chez le peuplier, il a été montré que les transcrits PtGSTU19, 20, 27, 30, 46 et 52 sont exprimés aussi bien dans les racines que dans les feuilles, les tiges ou encore les bourgeons (Lan *et al.*, 2009).

**Tableau 2 :** Correspondances entre la nomenclature proposée par (Lan *et al.*, 2009) et les identifiants retrouvés sur le portail Phytozome (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html) pour les GSTs Tau de peuplier (*Populus trichocarpa*, version 3.1 et version 1.1). / signifie qu'aucun gène n'est associé à l'identifiant de la version antérieure (postérieure) de publication du génome.

| Version3.1 | Version1.1 | Lanet al., 20 09 | Version3.1 | Version1.1 | Lanet al., 200 9 |
|---|---|---|---|---|---|
| **Potri.001G394800** | POPTR_0001s40510 | PtGSTU56 | **Potri.011G114000** | POPTR_0256s00200 | PtGSTU27 |
| **Potri.001G431200** | / | / | **Potri.011G140400** | POPTR_0878s00210 | PtGSTU33 |
| **Potri.001G431300** | / | / | **Potri.011G140600** | POPTR_0011s14380 | PtGSTU32 |
| **Potri.001G431400** | / | / | **Potri.011G140700** | POPTR_0700s00200 | PtGSTU31 |
| **Potri.001G431600** | / | / | **Potri.011G140800** | POPTR_0011s14410 | PtGSTU30 |
| **Potri.001G431700** | POPTR_0001s42770 | PtGSTU54 | **Potri.012G050100** | / | / |
| **Potri.001G436500** | POPTR_0001s42750 | PtGSTU1 | **Potri.012G050200** | / | / |
| **Potri.001G436600** | POPTR_0001s42760 | PtGSTU2 | **Potri.012G052200** | POPTR_0012s04770 | PtGSTU26 |
| **Potri.001G436700** | / | / | **Potri.013G072400** | POPTR_0013s06950 | PtGSTU41 |
| **Potri.001G436800** | POPTR_0001s42780 | PtGSTU5 | **Potri.015G042000** | POPTR_0015s04200 | PtGSTU46 |
| **Potri.001G437000** | POPTR_0001s42790 | PtGSTU6 | **Potri.016G023200** | POPTR_0016s02370 | PtGSTU24 |
| **Potri.001G437100** | POPTR_0001s42820 | PtGSTU7 | **Potri.016G118500** | POPTR_0016s12600 | PtGSTU25 |
| **Potri.001G437200** | POPTR_0001s42800 | PtGSTU8 | **Potri.019G130500** | / | / |
| **Potri.001G437400** | POPTR_0001s42820 | PtGSTU9 | **Potri.019G130600** | / | / |
| **Potri.002G254000** | POPTR_0002s25530 | PtGSTU44 | **Potri.T149500** | / | / |
| **Potri.004G080400** | / | / | **Potri.T178900** | / | / |
| **Potri.004G080700** | POPTR_0004s07880 | PtGSTU35 | **/** | POPTR_0001s42770 | PtGSTU3 |
| **Potri.004G196700** | POPTR_0004s20760 | PtGSTU57 | **/** | POPTR_0001s42820 | PtGSTU4 |
| **Potri.006G024200** | POPTR_0006s02510 | PtGSTU18 | **/** | POPTR_0001s42820 | PtGSTU10 |
| **Potri.008G174900** | POPTR_0008s17500 | PtGSTU19 | **/** | POPTR_0019s15090 | PtGSTU15 |
| **Potri.008G175000** | POPTR_1996s00210 | PtGSTU20 | **/** | POPTR_0019s15090 | PtGSTU16 |
| **Potri.008G175100** | / | / | **/** | POPTR_0019s15100 | PtGSTU17 |
| **Potri.010G032800** | POPTR_0010s03960 | PtGSTU51 | **/** | POPTR_1996s00210 | PtGSTU21 |
| **Potri.010G035500** | POPTR_0010s04490 | PtGSTU22 | **/** | POPTR_0010s08170 | PtGSTU23 |
| **Potri.010G060900** | POPTR_0010s07070 | PtGSTU12 | **/** | POPTR_0004s07840 | PtGSTU34 |
| **Potri.010G061100** | POPTR_0010s07090 | PtGSTU11 | **/** | POPTR_0010s07180 | PtGSTU36 |
| **Potri.010G061200** | POPTR_0010s07100 | PtGSTU50 | **/** | POPTR_0010s07120 | PtGSTU37 |
| **Potri.010G061400** | / | / | **/** | POPTR_0010s07180 | PtGSTU38 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Potri.010G061600** | POPTR_0010s07150 | PtGSTU14 | **/** | POPTR_0700s00200 | PtGSTU39 |
| **Potri.010G061700** | POPTR_0010s07170 | PtGSTU13 | **/** | POPTR_0700s00200 | PtGSTU42 |
| **Potri.010G061800** | / | / | **/** | POPTR_0002s25530 | PtGSTU43 |
| **Potri.010G061900** | / | / | **/** | POPTR_0016s10120 | PtGSTU45 |
| **Potri.010G070900** | POPTR_0010s08170 | PtGSTU52 | **/** | POPTR_0010s07100 | PtGSTU47 |
| **Potri.011G112900** | POPTR_0011s11420 | PtGTU28 | **/** | POPTR_0010s07100 | PtGSTU48 |
| **Potri.011G113000** | POPTR_0011s11430 | PtGSTU40 | **/** | POPTR_0001s42750 | PtGSTU49 |
| **Potri.011G113100** | / | / | **/** | POPTR_0010s07100 | PtGSTU53 |
| **Potri.011G113300** | POPTR_0256s00210 | PtGSTU29 | **/** | POPTR_0011s11430 | PtGSTU55 |
| **Potri.011G113400** | / | / | **/** | POPTR_0005s04000 | PtGSTU58 |

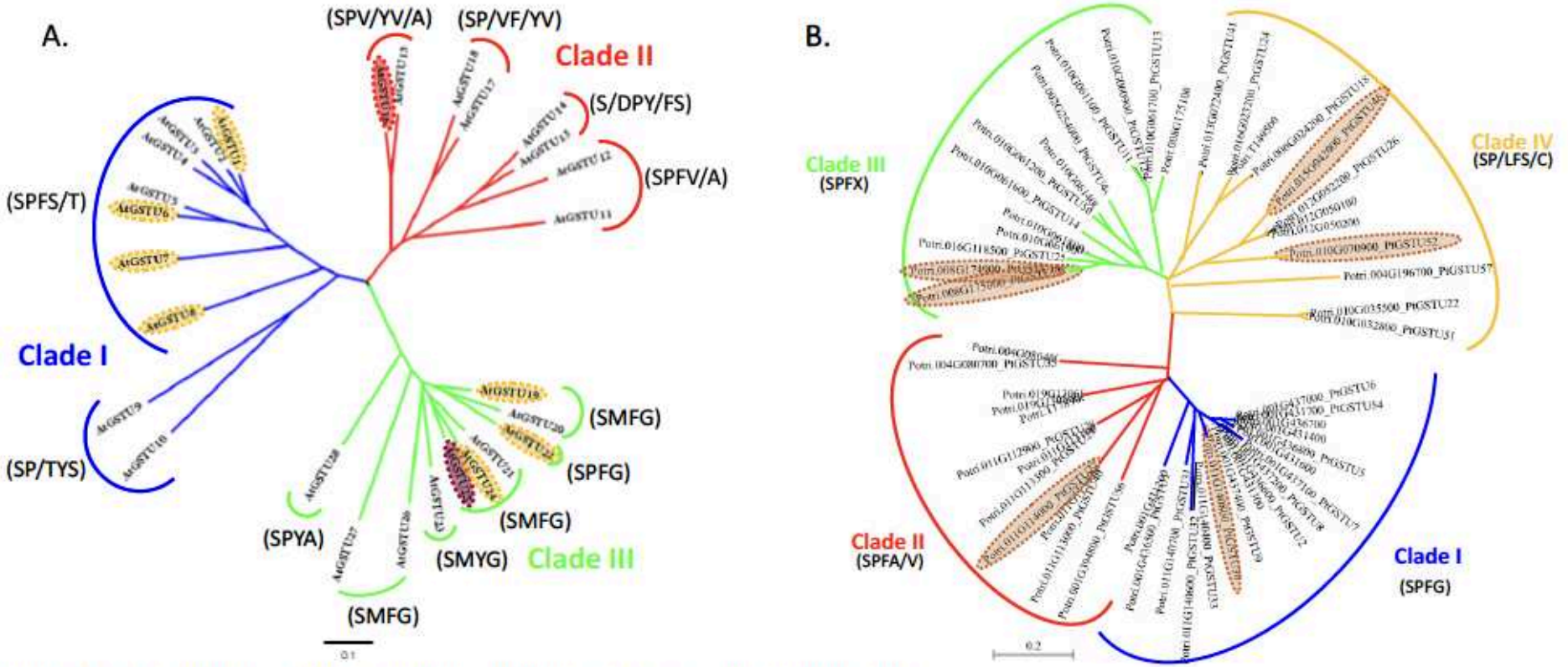
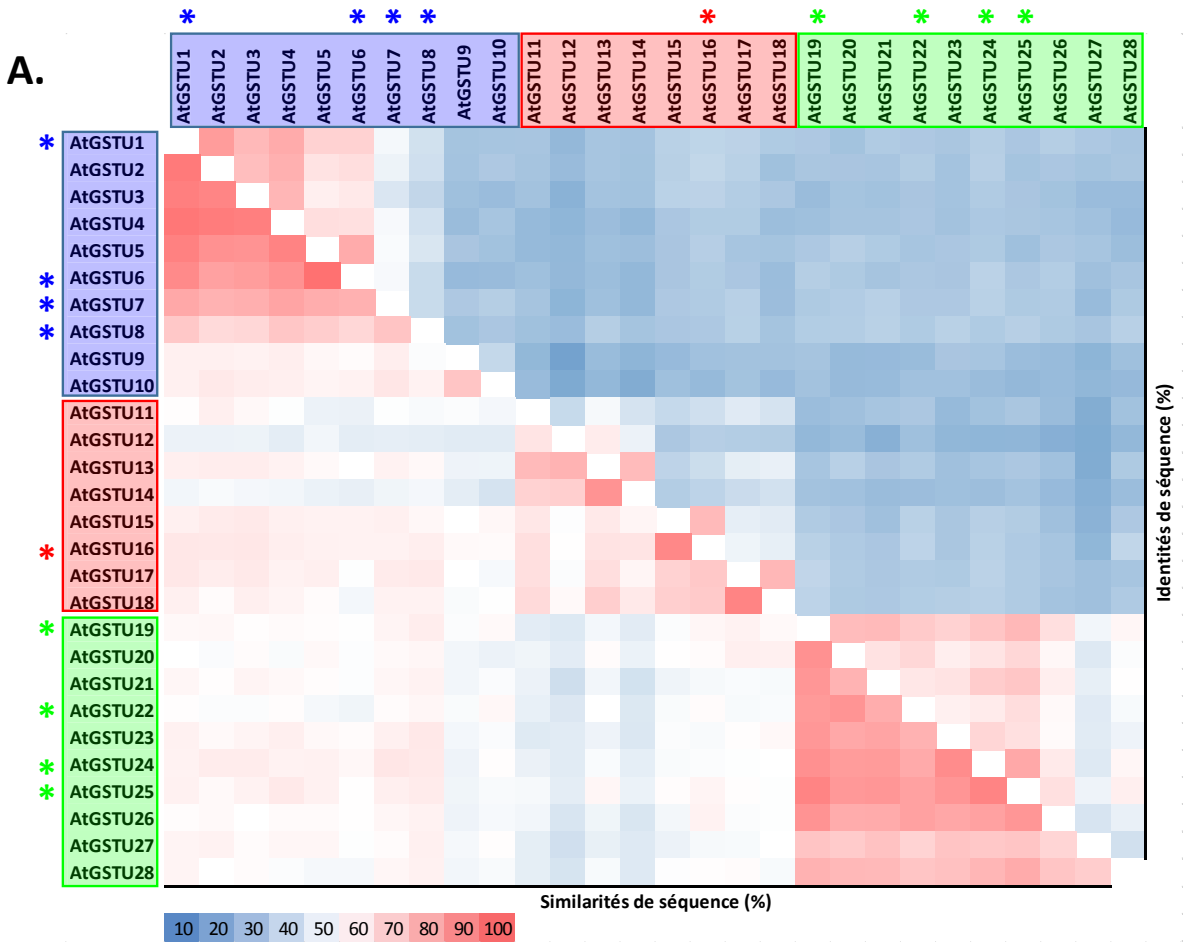



**Figure 15 : Phylogénie des GSTUs d'*Arabidopsis thaliana* (A) et de *Populus trichocarpa* (B).**

Les séquences protéiques ont été récupérées du portail Phytozome 12 ; les séquences des protéines AtGSTUs proviennent de l'annotation TAIR10 alors que celles des PtGSTUs proviennent de la version 3.1 du génome de *Populus trichocarpa* disponible sur le portail Phytozome (v12). Lorsque cela a été possible les séquences de peuplier ont été renommées selon l'annotation de (Lan *et al.*, 2009). Les arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide du logiciel BioNJ (Seaview) après curation de l'alignement avec le logiciel GBlocks puis édition manuelle et représentation à l'aide du logiciel Figtree (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree). Leur robustesse a été vérifiée par la méthode du bootstrap (500 répétitions). L'échelle correspond à 0,1 substitution par position. Les résidus composant le site catalytique de ces GSTs sont indiqués. Les protéines AtGSTUs dont l'expression des gènes est augmentée chez le mutant *pdr9-2* sont cerclées de jaune, la protéine AtGSTU25 dont l'expression de gène est augmentée lors d'une carence en fer (Lan *et al.*, 2011) est entourée en violet et la protéine AtGSTU16 dont le gène est principalement exprimé dans les feuilles est entourée en rouge (A) alors que les GSTUs de peuplier d'intérêt sont entourées en marron (B).


A.
AtGSTU1
AtGSTU2
AtGSTU3
AtGSTU4
AtGSTU5
AtGSTU6
AtGSTU7
AtGSTU8
AtGSTU9
AtGSTU10
AtGSTU11
AtGSTU12
AtGSTU13
AtGSTU14
AtGSTU15
AtGSTU16
AtGSTU17
AtGSTU18
AtGSTU19
AtGSTU20
AtGSTU21
AtGSTU22
AtGSTU23
AtGSTU24
AtGSTU25
AtGSTU26
AtGSTU27
AtGSTU28
Identités de séquence (%)
Similarités de séquence (%)
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

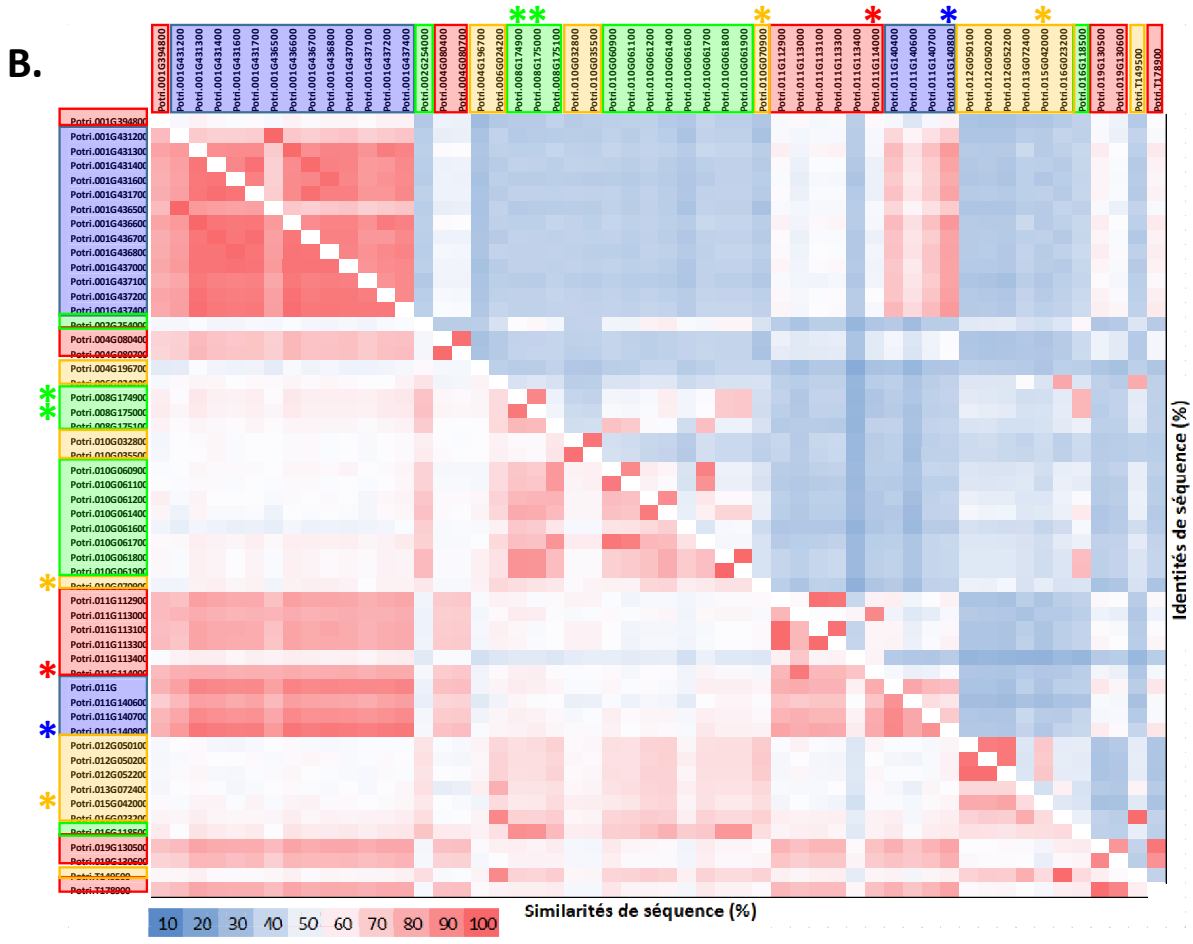

B.
Identités de séquence (%)
Similarités de séquence (%)
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

**Figure 16 :**

Les alignements des séquences primaires des protéines AtGSTUs et PtGSTUs ainsi que le calcul des similarités et des identités de séquence ont été effectués à l'aide du logiciel MatGat 2.0. Les cartes thermiques ont été construites avec le logiciel Excel. Les séquences des GSTUs de peuplier sont issues de la version 3.1 du génome de *Populus trichocarpa* disponible sur le portail Phytozome (v12). Les isoformes constituant les clades I, II, III et IV sont respectivement encadrées en bleu, rouge, vert et jaune. Les protéines d'intérêt sont signalées par un astérisque de la couleur du clade auquel elles appartiennent.

## B. Production et purification des protéines

Les séquences codantes des 9 isoformes de GSTUs d'*Arabidopsis thaliana* (AtGSTU1, 6, 7, 8, 16, 19, 22, 24 et 25) étudiées au cours de cette thèse ont été clonées puis les protéines correspondantes produites sous la forme de protéines recombinantes chez la bactérie *E. coli* puis purifiées. Toutes ces protéines ont été obtenues selon une stratégie expérimentale identique incluant une production en système hétérologue bactérien et une purification en deux étapes associant une chromatographie d'affinité sur métal immobilisé (IMAC) et une chromatographie d'exclusion stérique. Les séquences codantes des 6 GSTUs de peuplier d'intérêt (PtGSTU19, 20, 27, 30, 46 et 52) ont également été clonées puis les protéines recombinantes produites et purifiées à l'aide d'un protocole légèrement différent impliquant une chromatographie d'exclusion stérique suivie d'une chromatographie échangeuse d'ion du fait de l'absence d'étiquette poly-histidine. Ces différentes stratégies nous ont permis d'obtenir des protéines recombinantes purifiées à homogénéité d'une pureté élevée compatible avec des analyses structurales et enzymatiques.

Lors de la purification de la protéine AtGSTU8, j'ai noté une modification de la coloration de la résine de chromatographie d'affinité sur métal immobilisé. En effet, cette dernière est passée du bleu au rose pâle lors du chargement de l'extrait protéique contenant la protéine recombinante (Figure 17).

**Figure 17 : r**
**cour pur**
**pr**
La couleur de la résine de chromatographie sur métal immobilisé (résine de type $Ni^{2+}$-NTA) est passée du bleu (gauche) au rose pâle (droite) pendant le chargement de l'extrait protéique contenant la protéine AtGSTU8.

Cette modification de coloration a suggéré que cette protéine co-purifie avec un métabolite provenant de la bactérie *E. coli*. Une analyse par spectrométrie de masse (ESI-QTOF) en conditions dénaturantes de la protéine purifiée a révélé la présence d'un métabolite possédant une masse de 616 daltons, non lié de façon covalente à la protéine AtGSTU8 et dont le spectre de masse superpose avec celui de l'hème (hème B) de la myoglobine. Nous avons alors entrepris la caractérisation biochimique et structurale de la protéine AtGSTU8 ainsi que des autres AtGSTUs sélectionnées dans le but d'étudier le rôle potentiel de ces enzymes dans le métabolisme des porphyrines. Bien que le métabolisme des porphyrines est étudié depuis de nombreuses années (voir introduction chapitre I), de nombreuses interrogations subsistent, entre autres, concernant leur transport inter-organelle.

Certains des résultats obtenus sont présentés sous forme d'un article hybride mêlant à la fois une revue bibliographique et des résultats expérimentaux. Cet article a été publié dans le journal *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Volume 375, Issue 1801. Cet

article met en lumière la capacité de la GSTU8 mais aussi d'autres GSTs de la classe tau telles que les protéines GSTU16 et 19 d'*A. thaliana* à lier de manière constitutive différents tétrapyrroles lors de leur production chez la bactérie *E. coli*. Cette capacité à lier des tétrapyrroles a également été testée *in vitro*. Ainsi, j'ai montré que les AtGSTU8 et 19 lient des tétrapyrroles avec une affinité de l'ordre du micromolaire à la dizaine de micromolaire. Aucune activité catalytique envers les tétrapyrroles testés n'a été cependant observée suggérant que ces GSTUs pourraient être impliquées dans le transport de ces molécules à travers leur propriété ligandine. L'analyse structurale réalisée par modélisation moléculaire suggère que le site putatif de fixation des tétrapyrroles est situé au niveau du site actif de l'enzyme. En effet, bien qu'aucun résidu clé impliqué dans la fixation n'ait pu être identifié au cours de notre étude, les tétrapyrroles semblent se fixer au niveau du site H de l'enzyme.

**Article 2 : Is there a role for tau glutathione transferases in tetrapyrrole metabolism and retrograde signalling in plants?**

Elodie Sylvestre-Gonon, Mathieu Schwartz, Jean-Michel Girardet, Arnaud Hecker et Nicolas Rouhier

Philosophical Transactions of the Royal Society B - Biological Sciences, 2020, volume 375, article 1801; doi: 10.1098/rstb.2019.0404

PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS B

royalsocietypublishing.org/journal/rstb

Opinion piece

**Cite this article:** Sylvestre-Gonon E, Schwartz M, Girardet J-M, Hecker A, Rouhier N. 2020 Is there a role for tau glutathione transferases in tetrapyrrole metabolism and retrograde signalling in plants? *Phil. Trans. R. Soc. B* **375**: 20190404.
http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2019.0404

Accepted: 24 January 2020

One contribution of 20 to a theme issue 'Retrograde signalling from endosymbiotic organelles'.

**Subject Areas:**
plant science, biochemistry

**Keywords:**
glutathione transferase, protoporphyrin, haem, ligandin, glutathione conjugation, tetrapyrrole

**Author for correspondence:**
Nicolas Rouhier
e-mail: nicolas.rouhier@univ-lorraine.fr

Electronic supplementary material is available online at https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.4927782.

THE ROYAL SOCIETY PUBLISHING

# Is there a role for tau glutathione transferases in tetrapyrrole metabolism and retrograde signalling in plants?

Elodie Sylvestre-Gonon, Mathieu Schwartz, Jean-Michel Girardet, Arnaud Hecker and Nicolas Rouhier

Université de Lorraine, INRAE, IAM, 54000 Nancy, France

MS, 0000-0002-2670-5274; J-MG, 0000-0002-1903-9031; AH, 0000-0003-4511-5410; NR, 0000-0002-2036-7884

In plants, tetrapyrrole biosynthesis occurs in chloroplasts, the reactions being catalysed by stromal and membrane-bound enzymes. The tetrapyrrole moiety is a backbone for chlorophylls and cofactors such as sirohaems, haems and phytochromobilins. Owing to this diversity, the potential cytotoxicity of some precursors and the associated synthesis costs, a tight control exists to adjust the demand and the fluxes for each molecule. After synthesis, haems and phytochromobilins are incorporated into proteins found in other subcellular compartments. However, there is only very limited information about the chaperones and membrane transporters involved in the trafficking of these molecules. After summarizing evidence indicating that glutathione transferases (GST) may be part of the transport and/or degradation processes of porphyrin derivatives, we provide experimental data indicating that tau glutathione transferases (GSTU) bind protoporphyrin IX and haem moieties and use structural modelling to identify possible residues responsible for their binding in the active site hydrophobic pocket. Finally, we discuss the possible roles associated with the binding, catalytic transformation (i.e. glutathione conjugation) and/or transport of tetrapyrroles by GSTUs, considering their subcellular localization and capacity to interact with ABC transporters.

This article is part of the theme issue 'Retrograde signalling from endosymbiotic organelles'.

## 1. Introduction

Tetrapyrrole-containing molecules (e.g. chlorophylls, haems, sirohaems and bilins) have critical roles in plants. Indeed, these molecules or cofactors are found attached to proteins involved in photosynthesis and respiration but also in signalling, for instance, during light perception and photomorphogenesis [1]. For this latter aspect, phytochromes, which sense red/far-red light, bind an open-chain tetrapyrrole (bilin), named phytochromobilin in higher plants. Compared to non-photosynthetic organisms, plants have thus a larger diversity of tetrapyrrole-containing molecules. They have also the peculiarity that tetrapyrrole synthesis occurs in plastids (figure 1), whereas the corresponding pathway in non-photosynthetic eukaryotes takes place in mitochondria, with some steps in the cytosol [2]. Hence, given the specific redox reactions occurring in plastids, this compartmentation implies the existence of very specific and tightly regulated mechanisms. For instance, several enzymes are subject to post-translational redox regulatory mechanisms, notably controlled by the thioredoxin reducing systems [2,3]. Also, the presence of light may be detrimental in some conditions as porphyrin derivatives such as protoporphyrin IX (PPIX), protochlorophyllide, free chlorophyll molecules themselves or to a lesser extent their degradation products are harmful photosensitizers.

Whereas there is no need to export sirohaem (a prosthetic group only found in the chloroplastic nitrite and sulfite reductases), phytochromobilin has to be inserted into apo-phytochromes synthesized in the cytosol, possibly in an

© 2020 The Author(s) Published by the Royal Society. All rights reserved.

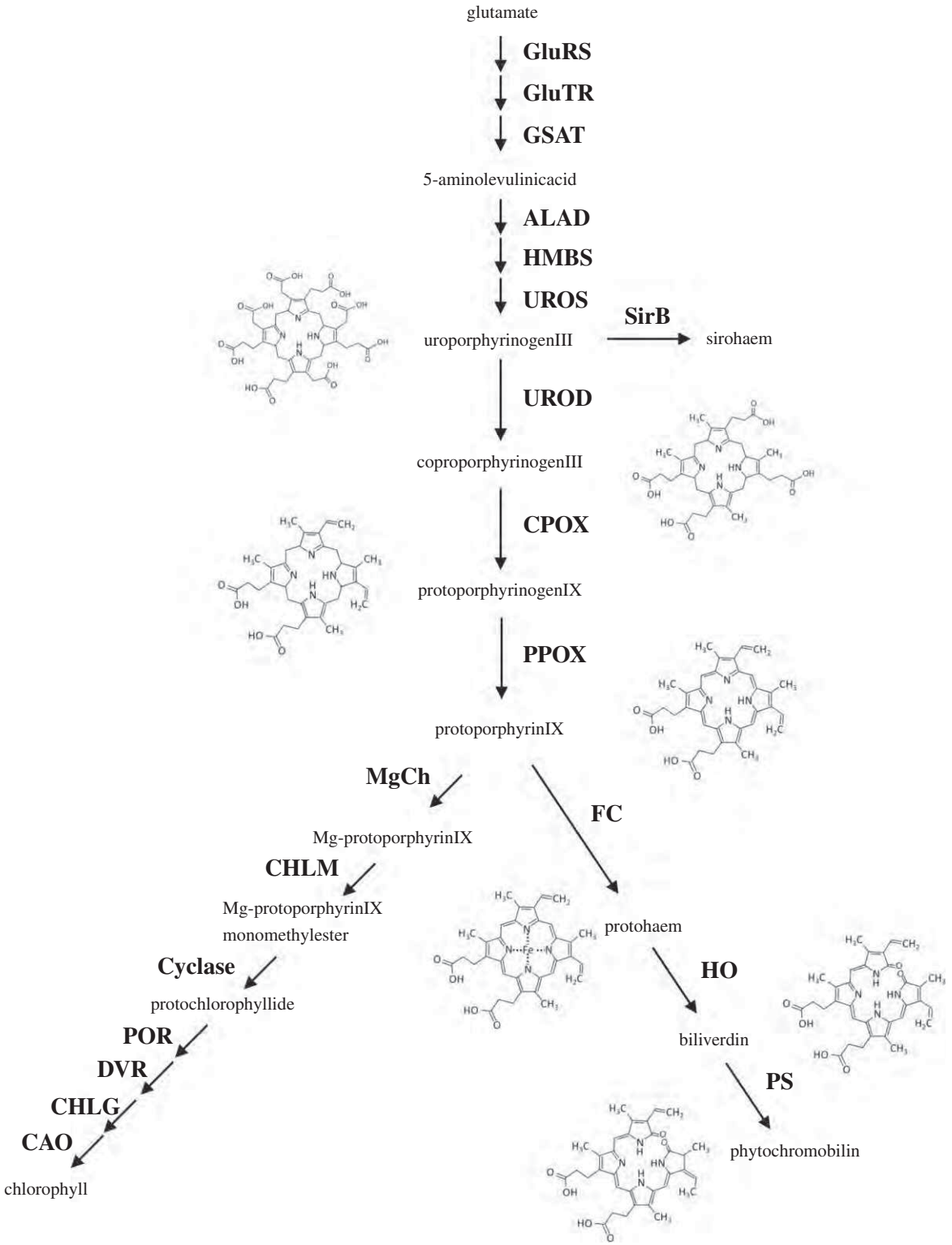



**Figure 1.** Key steps of the tetrapyrrole biosynthesis pathway in plastids including the structures of some representative moieties. Enzymatic steps in this biosynthetic pathway, starting from glutamate, are represented by arrows with the names of the enzymes indicated in bold. Only the names and structures of tetrapyrroles mentioned in the text are shown. Abbreviations of the enzyme names are as follows: glutamyl-tRNA synthase (GluRS), glutamyl-tRNA reductase (GluTR), glutamate-1-semialdehyde aminotransferase (GSAT), 5-aminolevulinate dehydratase (ALAD), porphobilinogen deaminase (HMBS), uroporphyrinogen III synthase (UROS), uroporphyrinogen III decarboxylase (UROD), coproporphyrinogen oxidase (CPOX), protoporphyrinogen oxidase (PPOX), sirohydrochlorin ferrochelatase (SirB), ferrochelatase (FC), haem oxygenase (HO), phytochromobilin synthase (PS), Mg-protoporphyrin IX chelatase (MgCh), Mg-protoporphyrin IX methyltransferase (CHLM), Mg-Protoporphyrin IX monomethylester cyclase (Cyclase), protochlorophyllide oxidoreductase (POR), C8-vinyl-reductase (DVR), chlorophyll *a* synthase (CHLG), chlorophyll *a* oxygenase (CAO).

autocatalytic reaction. Also, chlorophyll catabolites, referred to as phyllobilins, are exported from the chloroplasts notably during stress response, fruit ripening or senescence. These linear tetrapyrroles are exported from plastids, further modified outside, i.e. at the endoplasmic reticulum (ER) or in the cytosol, before reaching the vacuoles through ATP-dependent transport [4]. Moreover, chlorophyll intermediates and haem moieties were proposed to act in the plastid-to-nucleus retrograde signalling, controlling the expression of nuclear-encoded photosynthetic genes [5,6]. The haem trafficking is

even more complex as, in addition to a function in retrograde signalling, haems are found in a number of proteins outside chloroplasts, including the cytosol but also other organelles, notably mitochondria and peroxisomes. This implies the existence of haem transport systems across membranes for intracellular, inter-organellar movements but also possibly for intercellular exchanges as documented in non-photosynthetic organisms. Unlike the process of haem synthesis and degradation, which is relatively well documented, most actors involved in haem transport and mobilization await identification, but several lines of evidence suggest a role for glutathione transferases (GSTs).

## 2. Synthesis, transport and degradation of haems

Haems are protein cofactors that are essential for several key biological processes, including oxygen transport as part of haemoglobins, but also of the respiratory and photosynthetic electron transfer chains being present in cytochromes and in reaction centres/complexes. They are also crucial for detoxification processes, being present in ascorbate peroxidases and catalases and in cytochrome P450 monooxygenases. The latter proteins are required for xenobiotic detoxification and/or secondary metabolism. After synthesis, haems must be transferred to their final destination and client proteins. This implies the existence of a labile cellular haem pool consisting of haems associated with chaperones. Using a recently developed genetically encoded fluorescent haem sensor, it was deduced that the labile haem pool in the cytosol or mitochondria from yeast is in the nanomolar range [7]. However, having free/labile haems may be deleterious to macromolecules and the cells have to strictly regulate both synthesis and degradation of haems, but also their transport and delivery to client proteins.

In plants, the synthesis starts in the chloroplast with glutamate that is converted through nine successive steps into PPIX (figure 1). These steps are common with the chlorophyll synthesis pathway and PPIX is the branch point where haem and chlorophyll syntheses bifurcate. The insertion of $Mg^{2+}$ by the Mg-chelatase will generate the chlorophyll precursor Mg-protoporphyrin IX, whereas the insertion of Fe by ferrochelatases will generate the protohaem giving rise to the formation of a, b- and c-type haems. The haem oxygenases (HOs) catalyse the oxidative degradation of haems into carbon monoxide (CO), biliverdin (BV) and $Fe^{2+}$, which has to be recycled. Terrestrial plants use BV for the synthesis of phytochromobilin in one reaction step catalysed by the phytochromobilin synthase HY2, whereas in animals, BV is converted into bilirubin by biliverdin reductase [8]. In *Arabidopsis*, there are four genes coding for HOs (HO1/HY1, HO2, HO3 and HO4) and a single gene coding for phytochromobilin synthase, all proteins being located in chloroplasts [8–10]. The activity of both enzyme families is dependent on ferredoxins in plants [8,11]. The absence of HO outside plastids raises the question of whether and how haems present in non-chloroplastic haemoproteins are recycled or degraded. Among the four HOs, HO1 has a predominant role over HO3 and HO4, whereas HO2 has no HO activity, i.e. it does not bind or degrade haem [9,12]. This is consistent with the absence of a conserved histidine residue that binds the central Fe atom of haem in other HOs. However, HO2 binds PPIX quite strongly, maybe explaining the existence of a phenotype which also suggested a defect in phytochromobilin synthesis [9,13].

Two pools of haems are generally considered in cells, the haems tightly bound within haemoproteins versus labile haems required for signalling and transfer into proteins. This theoretically requires soluble haem chaperones for holding and delivering haems within and towards the different subcellular compartments where haemoproteins are found, starting from the chloroplastic site of synthesis. This also implies the existence of several haem membrane transporters for inter-organellar exchanges. A good candidate protein for intracellular haem trafficking should bind haem with a good but not too high affinity to deliver haems successfully to haem transporters or target proteins. In animal systems, several proteins have been proposed to serve in haem trafficking, including the haem-binding proteins (HBPs) [14], some fatty acid-binding proteins [15], the glycolytic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [16] and also glutathione S-transferases (see §3). In fact, the in-cell haem-binding capacity of such candidate haem chaperones has not been often demonstrated, but it was recently reported that human GAPDH binds haem in cells and delivers it to downstream targets such as the inducible nitric-oxide synthase (iNOS) [16]. There are two cytosolic GAPDH in *Arabidopsis thaliana* (GAPC1 and GAPC2). At this time, it is not known whether they could also play a similar role, but they do possess the histidine residue, which was shown to be crucial in the human orthologue for haem binding and exchange. Five HBPs have been so far characterized in *A. thaliana*, including two in the chloroplasts (HBP3 and 5) and three in the cytosol [17,18]. The cytosolic HBP1 and HBP2 from *A. thaliana* were shown to bind PPIX and haem [17], with HBP1, HBP2 and HBP5 but not HBP3 being able to bind to a haemin-agarose affinity column, possibly indicating different functions for HBP3 and HBP5 in chloroplasts [18]. In addition, *Arabidopsis* HBP5, but not other HBPs, was found to interact with HY1, suggesting that it might be specifically involved in the delivery of haem to HY1 [18].

In fact, a strategy or adaptation to avoid implicating too many intermediates in haem trafficking is via the formation of complexes, notably those involving ferrochelatases. There are two genes (*FC1* and *FC2*) in *A. thaliana*, which have different functions in accordance with their different expression patterns and the phenotypic analysis of plant mutants, but both are important for chloroplast development. The FC1 may more specifically produce the haem portion used as a retrograde signal to coordinate the expression of specific genes required during chloroplast development [19]. The FC2 may be more specifically important for the maturation of photosynthetic cytochromes [20]. Both FC1 and FC2 are important for stress responses [21,22]. These plant ferrochelatases may be located in both the thylakoid and chloroplast envelope membranes [23]. This might allow the release of haems within the chloroplasts without relying on a chaperone or the export of haems to the cytosolic side, either alone or by making direct interactions with some haem transporter(s), the identity of which remains, however, enigmatic so far. In animals, several transporters including ATP-binding cassette (ABC) transporters have been proposed to serve for the transport of haems or haem intermediates such as coproporphyrinogen III between the cytosol and mitochondria (reviewed in [24]), suggesting that plant ABC transporter orthologues may perform similar functions in the chloroplast envelope and elsewhere. One possible candidate

for the translocation of haems and other tetrapyrrole intermediates across organelle membranes is the translocator protein (TSPO). In *Arabidopsis*, there is a single gene coding for this haem- and PPIX-binding, stress-responsive membrane protein [25], which is virtually found in all subcellular compartments (mitochondria, plastids, nuclear fractions, ER and Golgi vesicles) where haem exchanges occur [26]. AtTSPO is regulated at the transcriptional level in tetrapyrrole biosynthetic mutants and in response to stresses, notably salt stress [26].

In conclusion, further work on all these potential haem chaperones and transporters is needed in plants as in other organisms to delineate a more complete model of haem trafficking and signalling.

## 3. The glutathione transferases: versatile, promiscuous proteins possessing both catalytic and ligandin functions

Glutathione (GSH) S-transferases represent a widespread and diversified protein family found in almost all organisms. In non-photosynthetic organisms, the number of GSTs ranges from 2 in *Plasmodium falciparum* to 44 in the fungus *Postia placenta* [27]. The number of isoforms has greatly expanded in photosynthetic organisms, resulting in the existence of 14 GST classes and up to 110 GST genes in *Eucalyptus grandis* [28,29]. Overall, there are over 30 different classes with only a few classes shared by all organisms (electronic supplementary material, table S1). GSTs catalyse two opposite reactions. Those having a conserved serine (Ser-GSTs) or tyrosine (Tyr-GSTs) perform GSH-conjugation reactions on electrophilic molecules, whereas those having a conserved catalytic cysteine (Cys-GSTs) catalyse deglutathionylation reactions, i.e. the removal of glutathione from small molecules [29,30]. For these reactions, the (co)-substrates (i.e. either glutathionylated substrates or both GSH and the electrophilic substrates) bind to the active site, which is traditionally defined as formed by a G-site for glutathione binding and by an H-site for hydrophobic substrate binding. The role of GSTs catalysing GSH-conjugation reactions has been well documented in the context of herbicide detoxification by crops, as part of the xenobiotic detoxification system [31]. In this process, GSTs conjugate GSH onto electrophilic molecules often pre-activated by reaction with cytochromes P450, before ABC transporters target the GSH-conjugated molecules to the vacuole or to the extracellular compartment. In some other circumstances, GSTs bind various types of molecules without catalysing GSH conjugation. Virtually all types of GSTs possess this so-called ligandin property. The ligands can be either accommodated in the active site or bound to ligandin (L) sites, which are usually situated at the dimer interface in the case of dimeric GSTs [32]. Thus, GSTs act as carrier/transport proteins serving for the storage or trafficking of various sorts of molecules, often towards ABC transporters. Another function of the ligandin activity of GSTs may be to provide a labile pool of molecules, in particular endogenous specialized metabolites.

Hence, GSTs are able to bind a plethora of structurally unrelated compounds. While the *in vitro* biochemical characterization of GSTs relies on a battery of model compounds or inhibitors, the physiological substrates or ligands often remain enigmatic. Concerning GSH-conjugated molecules, only very few natural reaction products of GSTs have been identified, possibly because (i) they are unstable and undergo reversible glutathionylation, (ii) the conjugation products of GSTs are very rapidly processed to derived metabolites, or (iii) the use of inactive proteins is required for freezing interactions which is often not achieved [33]. In plants, it was described that GSTF6 participates in the synthesis of camalexin by catalysing the conjugation of GSH onto the indole-3-acetonitrile precursor [34] and GSTU13 in the metabolism of indole glucosinolates [35]. Concerning the non-catalytic, ligandin functions of GSTs, i.e. the transport or sequestration of specialized metabolites or some of their intermediates, one would reasonably assume that interactions are more stable and should allow for the isolation of these ligands. Still, fishing experiments performed in bacterial or plant cells are not so trivial and only a few GST ligands are known, considering the high number of isoforms in plants. The best documented example of a non-catalytic ligandin property of GSTs relates to the accumulation of anthocyanins in vacuoles. In *A. thaliana*, GSTF12, also referred to as TRANSPARENT TESTA 19 (TT19), plays a key role in the control of anthocyanin and proanthocyanidin vacuolar accumulation [36], ensuring the transport (without GSH conjugation) of these cytosolic flavonoids to a tonoplastic ABC transporter named TT12 [37]. Other studies have aimed at isolating and identifying substrates/ligands, mostly for phi and tau GSTs, either from plants or eventually *Escherichia coli* and using both *in vitro* and *in vivo* approaches (recently summarized in [29]). To cite a few examples, both GSTLs and GSTFs bind flavonoids [30,38–42], GSTFs and GSTUs bind glutathionylated conjugates of oxylipins [38], with GSTUs also binding stilbenes (trans-resveratrol) [39], fatty acid derivatives [40] and porphyrin derivatives [38,41–43]. Together, this indicates that GSTs are generally promiscuous proteins having a rather broad ligand/substrate spectrum, although oriented towards heterocyclic molecules.

## 4. Evidence for the connection between glutathione transferases and haem metabolism in both non-plant and plant cells

In the 1970s and 1980s, several studies reported a tight connection between GSTs and haem detoxification and/or transport, notably in mammals, with numerous publications describing interactions of GSTs of the alpha, pi and mu classes with steroids, bile acids, haem and its degradation product bilirubin [44–47]. Later on, studies using GSTs from natural sources or using recombinant systems have analysed the capacity of these proteins to bind haematin, haemin or bilirubin but also some precursors, such as PPIX and coproporphyrin, essentially using inhibition kinetics and intrinsic fluorescence quenching (table 1). Whereas some effects/interactions have been observed for most tested proteins, there is no unifying conclusion as competitive, non-competitive and uncompetitive inhibitions have been observed depending on the proteins considered. This suggested that some GSTs bind porphyrins in their active sites, whereas some others bind it elsewhere, very likely in their ligandin sites. When analysed, only one binding site was usually described. Inhibition studies using the cytosolic GST from *Plasmodium falciparum* revealed an uncompetitive inhibition mechanism towards GSH. It suggested also that haem preferentially binds to a preformed enzyme–GSH

**Table 1.** Summary table presenting affinity constants obtained from inhibition studies performed using GSTs from various sources and several tetrapyrroles. GSH, glutathione; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; ANS, 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid.

| organisms | GST names | tested ligands/ inhibitors | affinity constants | type of inhibition | approaches | references |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Plasmodium falciparum* | PfGST | haemin | $K_i$ 6.5 µM, $IC_{50}$ 4 µM | uncompetitive (GSH) | inhibition kinetics | [48] |
| | | protoporphyrin IX | $K_i$ 10 µM, $IC_{50}$ 11 µM | mixed-type (GSH) | inhibition kinetics | [48] |
| | | ferriprotoporphyrin IX | $K_d$ 0.03 µM (+1 mM GSH) | uncompetitive | intrinsic fluorescence quenching | [49] |
| | | ferriprotoporphyrin IX | $K_i$ 3 µM | uncompetitive | inhibition kinetics | [49] |
| | | haemin | $K_i$ 0.4 µM | non-competitive (GSH) | inhibition kinetics | [50] |
| | | | $K_i$ 0.6 µM | competitive (CDNB) | inhibition kinetics | [50] |
| | | protoporphyrin IX | $K_i$ 26 µM | non-competitive (GSH) | inhibition kinetics | [50] |
| | | | $K_i$ 29 µM | non-competitive (CDNB) | inhibition kinetics | [50] |
| | Exp1 (MAPEG-like) | haematin | $K_i$ 0.17 µM | competitive (CDNB) | inhibition kinetics | [51] |
| | | haematin | $K_M$ 0.25 µM | GSH conjugation | mass spectrometry | [51] |
| human | mPGES-2 | haem | $K_d$ 0.54 µM | — | intrinsic fluorescence quenching | [52] |
| mouse | GSTM1 | haemin | $K_i$ 1.5 µM | non-competitive (GSH) | inhibition kinetics | [50] |
| | | | $K_i$ 0.6 µM | non-competitive (CDNB) | inhibition kinetics | [50] |
| | | protoporphyrin IX | $K_i$ 7.3 µM | non-competitive (GSH) | inhibition kinetics | [50] |
| | | | $K_i$ 35 µM | non-competitive (CDNB) | inhibition kinetics | [50] |
| human | GSTP1 | haemin | $K_i$ 2.5 µM | competitive (GSH) | inhibition kinetics | [50] |
| | | | $K_i$ 3.8 µM | competitive (CDNB) | inhibition kinetics | [50] |
| | | protoporphyrin IX | $K_i > 50$ µM | competitive (GSH) | inhibition kinetics | [50] |
| | | | $K_i > 100$ µM | competitive (CDNB) | inhibition kinetics | [50] |
| human | placenta GSTP1 | haemin | $K_d$ 20 and 400 nM | | intrinsic fluorescence quenching | [53] |
| human | | haemin | $K_i$ 4 µM | non-competitive (ClPh(NO2)2) | inhibition kinetics | [53] |
| *Taenia solium* | Ts26GST | haematin | $K_i$ 0.3 µM $K_d$ 0.7 µM | non-competitive (CDNB) | inhibition kinetics, intrinsic fluorescence quenching (or with ANS) | [54] |
| | | mesoporphyrin | $K_i$ 0.5 µM $K_d$ 1.1 µM | non-competitive (CDNB) | inhibition kinetics, intrinsic fluorescence quenching (or with ANS) | [54] |
| | | protoporphyrin | $K_i$ 4 µM $K_d$ 2.7 µM | non-competitive (CDNB) | inhibition kinetics, intrinsic fluorescence quenching (or with ANS) | [54] |
| | | coproporphyrin | $K_i$ 1 µM $K_d$ 2.6 µM | non-competitive (CDNB) | inhibition kinetics, intrinsic fluorescence quenching (or with ANS) | [54] |

(*Continued*.)

**Table 1.** (*Continued.*)

| organisms | GST names | tested ligands/ inhibitors | affinity constants | type of inhibition | approaches | references |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Zea mays* | I–I | protoporphyrin IX | $IC_{50}$ 1–5 µM | non-competitive (CDNB), competitive (GSH) | inhibition kinetics | [42] |
| | | coproporphyrin | $K_d$ 0.89 µM | non-competitive (CDNB), competitive (GSH) | porphyrin fluorescence emission changes | [42] |
| | I–II | protoporphyrin IX | | | inhibition kinetics | [42] |
| | II–II | protoporphyrin IX | $IC_{50}$ 10–25 µM | non-competitive (CDNB), competitive (GSH) | inhibition kinetics | [42] |
| | | coproporphyrin | $K_d$ 0.51 µM | | porphyrin fluorescence emission changes | [42] |
| | III–III | protoporphyrin IX | $IC_{50}$ 5–10 µM | | inhibition kinetics | [42] |
| | | coproporphyrin | $K_d$ 0.27 µM | | porphyrin fluorescence emission changes | [42] |
| | | mesoporphyrin | $K_d$ 1.93 µM | | porphyrin fluorescence emission changes | [42] |

complex and that a high-affinity binding site with a dissociation constant ($K_d$) value of 30 nM was present [48,49,55]. To the contrary, a study performed with a placenta pi GST suggested the existence of two binding sites with affinities of 20 and 400 nM, which are modulated by GSH [53]. While there is no exhaustive comparative study, this is clearly complicated by the existence of as many as 30 different GST classes (all organisms considered) exhibiting different catalytic and structural properties (electronic supplementary material, table S1) [56]. In most studies, $K_d$ constants, inhibitor binding affinity ($K_i$) constants or half maximal inhibitory concentration ($IC_{50}$) values ranging from the nanomolar to the micromolar range have been measured (table 1). Although we consider that values above 10–15 µM obtained in these *in vitro* studies are less relevant, many factors, such as the presence of GSH or the nature of the bound porphyrins, might modulate the affinities of GSTs for porphyrins *in cellulo*. On a physiological note, the binding of porphyrins was often perceived as a detoxification mechanism, removing or recycling degradation products, but a haem chaperone function has been suggested for a cytosolic liver GST from rat as early as in the 1980s because it facilitated the haem reconstitution into an apocytochrome b5 from a mitochondrial fraction [57].

During their life cycle, haematophagous insects or parasites that affect humans encounter massive amounts of haems, which act as prooxidant molecules once liberated from the hydrolysis of host haemoglobin. In the kissing bug *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease, haem degradation proceeds via the formation of thioether bonds between a cysteine and the vinyl side chains of biliverdin [58]. Whereas only species with one or two cysteinyl-glycine residues bound to biliverdin have been detected by mass spectrometry, it is very likely that these dipeptides derive from glutathione molecules from which the glutamate was removed. Whether this step of haem digestion is spontaneous or catalysed by some GSTs present notably in insect heart will have to be explored. In parasites such as *P. falciparum*, an alternative detoxification strategy to haem polymerization is to degrade it despite the absence of an HO activity. In fact, GSH spontaneously disrupts haems at neutral pH in the presence of oxygen [59]. The presence of iron seems mandatory as there is no reaction with Zn-protoporphyrin or an iron-free protoporphyrin. A role for GSH and GSTs in haem degradation in this organism is supported by the observation that GSH levels and GST activity are significantly increased in parasites resistant to the anti-malarial drug chloroquine, that promotes intracellular haemin accumulation [60]. There are two GSTs in *P. falciparum*. The soluble PfGST is uncompetitively inhibited by haemin ($K_i$ around 6.5 µM), indicating that free haemin can be bound by the enzyme [48]. The essential microsomal MAPEG-type GST, EXP1, has proven to degrade haematin efficiently in the presence of GSH [51], suggesting a physiological role in coping with the cytotoxic effects of haems. The affinity of EXP1 for haem is likely much better than that of the soluble PfGST as the GST activity of EXP1 is competitively inhibited by haematin with a $K_i$ of 170 nM [51]. Interestingly, this activity towards haematin was not observed for a human microsomal GST (MGST1). On another note, a recombinant form of the soluble domain of the human mitochondrial prostaglandin E synthase (mPGES2) was purified with a bound haem and displays a $K_d$ of 0.54 µM [52]. A GSH molecule also binds to the active site and forms an S–Fe coordination bond with the haem iron atom.

The first report of an interaction of tetrapyrroles with GSTs from photosynthetic organisms was published in 1988. The GST activity of a crude extract of etiolated oat seedlings was inhibited by chlorophyllin and haemin and to a lesser extent by bilirubin and biliverdin [61] and this was later confirmed by using a purified GST heterodimer [62]. In 2003, it was reported that maize GST isoforms, comprising GSTF and GSTU homodimers or

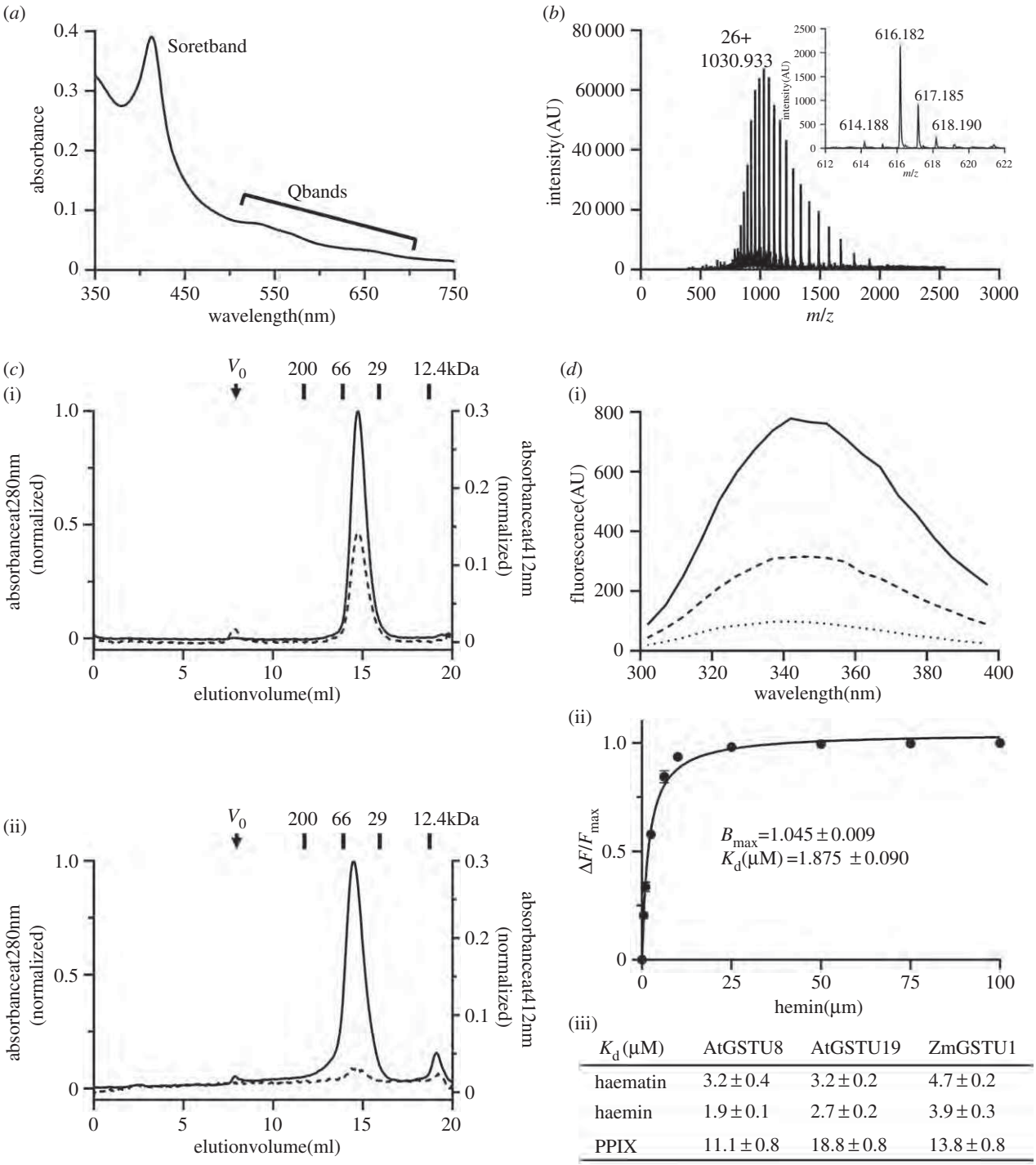
GSTF/U heterodimers, were able to bind PPIX but also other porphyrin precursors such as coproporphyrin, uroporphyrin and Mg-protoporphyrin with $K_d$ values in the low micromolar range (table 1) [42]. Haemin had no significant inhibitory effect. As there was no evidence for the formation of glutathionylated products, it was suggested that porphyrin binding relies on the ligandin properties of GSTs [42,43]. In fact, these GSTs were reported as preventing the non-enzymatic autoxidation of protoporphyrinogen and reducing the oxidative degradation of haemin. The observed competitive and non-competitive inhibitions with GSH and CDNB, respectively, suggested that porphyrins were bound to the G-site. In following studies, it was noted that the overexpression in *E. coli* of two maize GSTUs, ZmGSTU1 and ZmGSTU2 to a lesser extent, but not of ZmGSTU3, ZmGSTF1 and ZmGSTF3, perturbed tetrapyrrole metabolism causing a reduction in haem B levels and an accumulation of porphyrin precursors (uroporphyrin, pentacarboxyl porphyrin, coproporphyrin and glutathionylated harderoporphyrin) [41]. Similarly, the expression of AtGSTU7 and AtGSTU19 in *E. coli* allowed their purification with protoporphyrin- and harderoporphyrin–glutathione conjugates, respectively [38]. Expression of strep-tagged proteins *in planta* (*Arabidopsis* or tobacco) neither perturbed the tetrapyrrole metabolism nor allowed for fishing of porphyrin molecules, likely because of their cytosolic localization [38,41]. However, expression of a ZmGSTU1–ZmGSTU2 chimeric protein in tobacco chloroplasts resulted in the accumulation of harderoporphyrin(ogen)–glutathione conjugates. In *in vitro* assays, both ZmGSTU1 and ZmGSTU2 catalysed the GSH conjugation of reduced protoporphyrinogen, used as a substrate instead of the related harderoporphyrin(ogen) [41]. However, they could not conjugate GSH on an oxidized PPIX form. This suggests that GSH conjugation occurs only on reduced porphyrins and might explain why it was not observed in former studies [42]. However, the enzymes were rapidly inactivated presumably because the GSH-conjugated products formed a stable complex with them. As porphyrin synthesis in chloroplasts proceeds via reduced porphyrinogen intermediates, it may be that some GSTUs or other GSTs present in this compartment catalyse their conjugation to GSH. Altogether, although the biological significance of these interactions is not yet clear, these observations suggest a role of GSTU in porphyrin binding, transport and/or scavenging in plants.

## 5. Further observations that tau glutathione transferases have the capacity to bind haem and protoporphyrin IX

### (a) *Arabidopsis thaliana* GSTU8 binds a haem b upon expression in *Escherichia coli*

A C-terminal $His_6$-tagged version of AtGSTU8 was expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. Immediately upon loading the bacterial lysate, a pink coloration was visible on the resin. The UV–visible absorption spectrum of the purified protein exhibited a particular absorption band at 410 nm (Soret band) and two smaller absorption bands around 550 and 650 nm (Q bands), which are characteristic of tetrapyrrole-containing molecules (figure 2*a*). To determine the nature of the metabolite co-purifying with the protein, mass spectrometry analyses in denaturing conditions were carried out. In addition to the AtGSTU8 polypeptide detected at the expected theoretical molecular mass of 26 777.2 Da, an isotopic massif with an *m*/*z* of 616.182 Da was also detected, which corresponded to the mass of a haem b as found in myoglobin for instance (figure 2*b*). In order to test whether AtGSTU8 is able to bind PPIX, we have incubated the apo-protein, that was obtained by expressing it in minimal medium and extensive dialysis, with an excess of PPIX. Analytical gel filtration experiments performed using both the apo-protein and the PPIX-incubated protein showed the presence of a major peak eluted at around 14 ml, a volume corresponding to an apparent molecular mass of *ca*44 kDa that we interpreted as dimers (figure 2*c*). The fact that AtGSTU8 and PPIX co-eluted at the same volume indicated that PPIX was bound to the protein. Then, we sought to determine the dissociation constant ($K_d$) of AtGSTU8 towards PPIX but also haematin and haemin (iron-hydroxylated and iron-chloride forms of haem b, respectively) using tryptophan fluorescence quenching titrations. We included two additional proteins, the GSTU1 from maize and GSTU19 from *A. thaliana*, for which an interaction with porphyrin derivatives was already reported [38,41]. The fluorescence of these proteins was quenched by adding increasing concentrations of porphyrin derivatives as shown for haematin and AtGSTU8 (figure 2*d*). By fitting the different curves obtained to the equation of a hyperbola, we determined the maximum number of binding sites ($B_{max}$) and $K_d$ values (figure 2*d*). The $B_{max}$ values were comprised between 1.05 and 1.1 site per protein meaning that there should be only one binding site. Using AtGSTU8, the dissociation constants measured for haematin and haemin were around 2–3 µM, whereas a value of 11 µM was found for PPIX (figure 2*d*). Values in the same range have been measured for ZmGSTU1 and AtGSTU19. The fact that the dissociation constants and thus affinities are better with Fe-bound haems as compared with an Fe-free protoporphyrin suggests that the presence of the Fe atom has some influence on ligand binding. Altogether, these results allowed us to conclude that AtGSTU8 was co-purified from *E. coli* cells with a haem b and has an affinity that would be favourable for haems exchange reactions.

Using a culture medium supplemented with $FeCl_3$ and aminolevulinic acid, we then sought to determine whether preparations containing more holoproteins can be obtained. Moreover, to assess how specific is this observation, we additionally expressed in *E. coli*: AtGSTU16 that belongs to the third major clade of *A. thaliana* GSTUs (electronic supplementary material, figure S1), AtGSTU22 that is close to AtGSTU19 and AtGAPC1 based on the assumption that it could bind similar prosthetic groups (see above). After purification using a single affinity chromatography step and dialysis, a UV–visible absorption spectrum was recorded for each protein (electronic supplementary material, figure S2) and the presence of porphyrin moieties analysed by LC-MS analysis (electronic supplementary material, figure S3). The results are summarized in table 2. No sign for the presence of porphyrin(s) was visible for AtGAPC1 in these conditions. Based on the sample coloration observed during IMAC and the ratio of absorbance at 280 and 412 nm, we concluded that all expressed GSTUs except AtGSTU22 were able to bind porphyrins. Accordingly, we could detect the presence of haem b in AtGSTU8 and AtGSTU16 and of harderoporphyrin and/or glutathionylated harderoporphyrin in AtGSTU19 and ZmGSTU1, as described previously [41]. All these data point to the existence of a certain specificity among GSTUs, with one isoform being apparently




| $K_d$ (μM) | AtGSTU8 | AtGSTU19 | ZmGSTU1 |
|---|---|---|---|
| haematin | 3.2 ± 0.4 | 3.2 ± 0.2 | 4.7 ± 0.2 |
| haemin | 1.9 ± 0.1 | 2.7 ± 0.2 | 3.9 ± 0.3 |
| PPIX | 11.1 ± 0.8 | 18.8 ± 0.8 | 13.8 ± 0.8 |

**Figure 2.** *Arabidopsis* GSTU8 binds a haem b. (*a*) Absorbance spectrum of as-purified AtGSTU8 showing an absorption band centred at 410 nm (Soret band) and several weaker absorption bands around 550 and 650 nm (Q bands). (*b*) Electrospray ionization (ESI) mass-to-charge ratio (*m/z*) spectra of AtGSTU8 and its co-purified metabolite (inset) obtained using a Bruker microTOF-Q spectrometer in denaturing conditions. From the multiply charged ion spectra initially obtained, we focused on the peak with 26 charges on the ion. The deconvolution of the ESI spectra of denatured AtGSTU8 indicated that the ion with an *m/z* of 1030.933 atomic mass units (amu) corresponded to a molecular mass of 26 777.2 Da. A molecule with a molecular mass of 616.182 Da corresponding to a haem b was also detected (inset). The intensity of the signal is represented as arbitrary units (AU). (*c*) Analytical gel filtration chromatogram of AtGSTU8. One hundred micrograms of AtGSTU8 at 3 µM were incubated in the absence (i) or presence (ii) of PPIX (100 µM) and then loaded on analytical gel filtration (Sephadex S200 10/300 connected to an AKTA purifier system) chromatography. Protein absorption was followed at 280 nm (solid line), and PPIX absorption was followed at 412 nm (dashed line). It is noteworthy that most unbound PPIX was retained on a filter that was added before the gel filtration column. $V_o$ means void volume. The calibration curve was obtained with the indicated standards. (*d*) Quenching of tryptophan intrinsic fluorescence ($\lambda$exc = 290 nm) of AtGSTU8 (solid line) by PPIX (2.5 µM dashed line or 6.25 µM dotted line) (i). Data were fitted to an equation describing binding to a single binding site (ii). Results are means ± s.d. ($n = 3$). $B_{max}$ value represents the maximum number of binding site. The apparent dissociation constant ($K_d$) values of AtGSTU8, AtGSTU19 and ZmGSTU1 for haematin, haemin and PPIX have been calculated from tryptophan fluorescence quenching experiments (iii).

unable to bind porphyrins, and some other binding different types (at least preferentially) of porphyrins (haem b versus harderoporphyrin). In the absence of structural information, structural modelling and sequence comparisons have been initiated to understand these differences.

## (b) Modelling of protoporphyrin/haem binding by tau glutathione transferases

Most GSTs are homodimeric assemblies constituted by two domains at the monomer scale (figure 3). The N-terminal

**Table 2.** Ligands bound to *E. coli* expressed recombinant GSTUs. All these proteins were expressed in *E. coli* using a medium supplemented with $FeCl_3$ and aminolevulinic acid, purified in a single IMAC step and dialysed before recording a UV–visible absorption spectrum (electronic supplementary material, figure S2) and performing an LC-MS analysis (electronic supplementary material, figure S3), as described in the electronic supplementary material. The $A_{280\ nm}/A_{412\ nm}$ column corresponds to the ratio between the recorded absorbance values at these specific wavelengths. The identification of haem b in AtGSTUs was confirmed by analysing a myoglobin sample in the same conditions. The assignment of the compounds found to co-purify with AtGSTU19 and ZmGSTU1 as harderoporphyrin derivatives is based on previous results obtained with ZmGSTU1 [41].

| protein | $A_{280\ nm}/A_{412\ nm}$ | ligand(s) detected | *m/z* |
|---|---|---|---|
| AtGSTU8 | 10 | haem b | 616.1780 |
| AtGSTU16 | 9 | haem b | 616.1865 |
| AtGSTU19 | 7 | harderoporphyrin | 609.2541 |
| AtGSTU22 | 29 | none | |
| ZmGSTU1 | 5 | harderoporphyrin; GS-harderoporphyrin | 609.2816; 916.3718 |

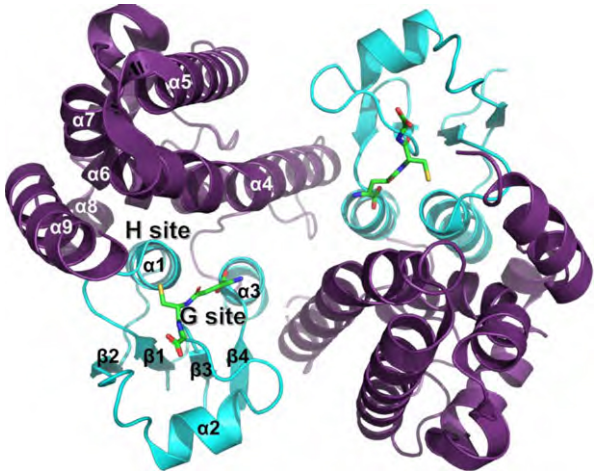



**Figure 3.** Crystal structure of OsGSTU1 dimer in complex with glutathione (PDB 1OYJ). *Oryza sativa* GSTU1 crystal structure [63] in complex with glutathione (green sticks). The N-terminal domain is coloured cyan and the C-terminal domain is coloured violet. Secondary structures and binding sites (for glutathione and for hydrophobic molecules) are labelled.

domain exhibits the TRX-fold ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$), whereas the C-terminal domain is mainly helical ($\alpha_4\alpha_5\alpha_6\alpha_7\alpha_8\alpha_9$). Concerning the tau class, 10 different GSTU crystal structures (not considering the structures corresponding to the same protein bound with different ligands) have been elucidated so far [29]. Overall, GSTUs exhibit a V-shaped, open dimer configuration with only 2200 $A^2$ of accessible surface area buried at the dimer interface, a value lower than most other GST classes. Notably, conserved salt bridges are found around the twofold axis at the solvent-exposed side of the dimer interface.

Structural features of GSTUs include specificities for the active site region. As for most other canonical GSTs, the GSTU catalytic region includes a glutathione binding site (G-site) at the N-terminal domain and a hydrophobic site (H-site) made of residues from both the N-terminal and the C-terminal domains. GSTUs exhibit a conserved serine residue at the N-terminal end of helix $\alpha_1$. This residue interacts with the $S_\gamma$ atom of glutathione through hydrogen bonding. Other polar contacts with the tripeptide include residues K42 (loop $\beta_2$–$\alpha_2$), I56 (loop $\alpha_2$–$\beta_3$), E68 and S69 (helix $\alpha_3$) (PDB 1OYJ, OsGSTU1 numbering). Concerning the H-site, studies have pointed to residues located in the vicinity of the conserved serine, in loop $\beta_1$–$\alpha_1$, helix $\alpha_4$, helix $\alpha_6$ and helix $\alpha_9$ [64–68]. A third site called the ligandin site was reported for *Glycine max* GSTU4-4 which binds one (4-nitrophenyl)methanethiol molecule in a hydrophobic region made of residues from helix $\alpha_1$, strand $\beta_2$ and helix $\alpha_8$ [66].

In 2008, Dixon *et al*. [41] identified two regions in which mutations potentially affected protoporphyrin binding using chimeric maize enzymes. These regions, located in the active site, were (i) the C-terminal part of helix $\alpha_4$ with an aromatic residue (Y112 in ZmGSTU1) putatively involved in ligandin activity and (ii) the loop $\beta_2$–$\alpha_2$ that notably bears the K42 residue of the G-site. Furthermore, molecular modelling studies suggested hydrophobic contributions of residues located in helix $\alpha_6$ and $\alpha_9$.

Our biochemical data indicate that AtGSTU8, AtGSTU16 and AtGSTU19 bind PPIX and/or haem. In the absence of structural information for these proteins, we used molecular docking to predict whether and how PPIX is accommodated in the active site of the recently solved AtGSTU23-GSH structure (PDB 6EP7) [69]. This isoform shares 68% sequence identity and high conservation of the active site residues with AtGSTU19. The best position predicted by Vina (affinity of 8.8 kcal mol) suggests PPIX binding at the H-site, in close vicinity of the G-site (figure 4). A hydrophobic cleft is provided by the side chains of the aromatic residues Y10 and Y15 (loop $\beta_1$–$\alpha_1$), Y107 and W114 (helix $\alpha_4$), W163 (helix $\alpha_6$) and H212 (helix $\alpha_9$), whereas an electropositive entry (K40 and K53 from helix $\alpha_2$ region, K111 from helix $\alpha_4$) putatively stabilizes the negatively charged carboxylic groups of PPIX. Such an exposed and amphiphilic site was reported in the crystal structure of the protoporphyrin-binding protein GUN4 (PDB 4XKB) [71] with a putative role in transport. Interestingly, W114 was previously found as interacting with a glycerol molecule bound at the H-site of AtGSTU23-GSH (PDB 6EP7), whereas the side chain of Y107 showed flexibility upon GSH binding in the same Protein Data Bank entry [69]. Three residues, namely K40, Y107 and W114 (AtGSTU23 numbering for clarity), were previously identified from the docking of PPIX in the OsGSTU1 active site [41]. Thus, our docking study suggests the binding of PPIX mainly at the H-site and very close to the G-site, which is consistent with the substrate competition observed during enzymatic measurements reported in many studies.

We compared the PPIX-bound AtGSTU23 model with the sole structure of a GST in complex with a porphyrin ligand, i.e. the one of human mPGES2 where a haem molecule in interaction with GSH is bound in the active site [52]. One coordination bond is found between the haem Fe atom and GSH $S_\gamma$ atom. Additional contacts include one H-bond with the side chain of H244 and hydrophobic contributions of Y107, F112, V243 and I246. Although the C-terminal domains of AtGSTU23 and mPGES2 show significant structural differences, they both bear an H-site, particularly large and solvent-exposed with a hydrophobic bottom and electropositive residues that line the entry of the pocket. Furthermore, conformations of the PPIX ring in both structures are similar, which indicates that PPIX binding in the AtGSTU23 active site is sterically possible. However, our structural analysis failed to identify a conserved residue that could assure

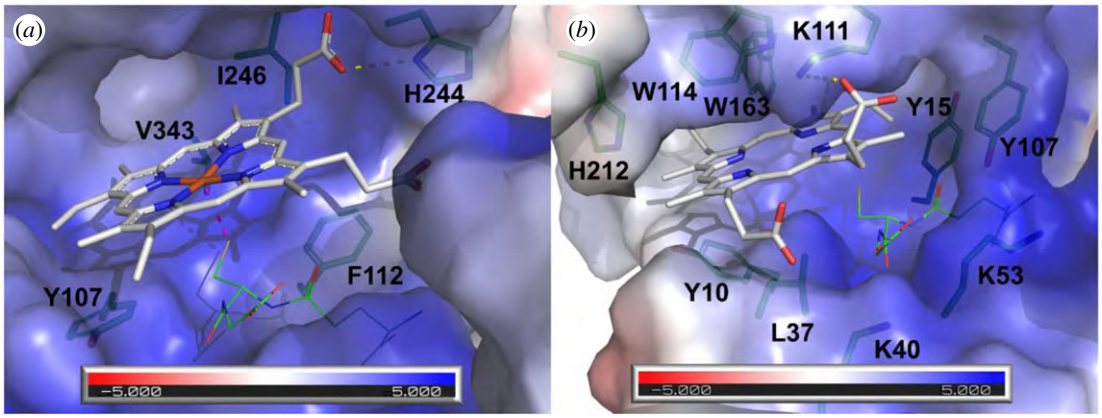



**Figure 4.** Comparison of the active sites from mPGES2 bound to haem and AtGSTU23 docked with protoporphyrin IX. (*a*) Crystal structure of human mPGES2 bound to GSH and haem (PDB code 2PBJ). (*b*) Docking of PPIX onto AtGSTU23 crystal structure (PDB code 6EP7). Molecular surfaces coloured according to the electrostatic potential were calculated with APBS software [70] and are shown in transparency. PPIX and haem are represented as white sticks. Residues that line the active sites are shown as green sticks. Putative H-bonds are shown as yellow dashed lines. Coordination bond between haem and GSH is shown as pink dashed line. GSH is shown as green lines.

coordination of the metal atom in the case of metalloporphyrins such as haems (usually a Cys, His, Asn or Gln residue). Whether a contribution of glutathione in the stabilization or GSH conjugation of tetrapyrroles exists in AtGSTU23, through an Fe–S coordination bond or via a covalent bonding at the vinyl groups, remains to be determined. Interestingly, previous crystallographic results obtained on fungal GST omega (which are close structural homologues of plant GSTUs) showed that the binding of both GSH and one polyphenol at the active site occurs without reaction between both molecules [72], suggesting that co-transport is also possible.

The putative residues identified via the docking study were mapped onto a multiple alignment performed with the sequences of all *A. thaliana* GSTUs and of the PPIX-binding ZmGSTU1 (electronic supplementary material, figure S4). Two residues (K40 and K52) that contribute to the electropositive environment are conserved in nearly all isoforms because they are also part of the highly conserved G-site. A contribution of aromatic or hydrophobic residues from helix $\alpha_9$ was suggested in the present work (H212) as well as a previous docking study (F213 and M217 in ZmGSTU1) [41]. The observed general trend for this helix is to bear hydrophobic residues at these positions. Importantly, it was previously shown that the conformation of helix $\alpha_9$ varies from one GSTU isoform to another, which putatively confers different binding properties to GSTUs [67]. However, such variations are not predictable on the sole sequence information. In one group of *Arabidopsis* isoforms (from AtGSTU19 to AtGSTU28), as well as in ZmGSTU1, aromatic residues are conserved at the positions of residues Y107, W114 and W163, suggesting that their H-site is adapted for tetrapyrrole binding. However, the fact that AtGSTU8 does not have these specific residues indicates differences in PPIX-binding mode from one isoform to another, as well as the existence of other structural determinants.

## 6. Hypotheses about the role(s) of glutathione transferases in relation to tetrapyrrole metabolism

As already mentioned, the GST family has expanded in plants with members of the overrepresented GSTU class (28 members in *A. thaliana*) having been reported as binding porphyrin moieties, but the potential associated physiological role(s) have never been discussed in detail [29]. The absence of genetic evidence may be due to redundancies existing among these multiple isoforms. Except for *A. thaliana* GSTU12, which has an N-terminal extension containing a nuclear localization signal (KKRKK) (electronic supplementary material, figure S4) and is therefore found in the nucleus [73], GSTUs are mostly predicted as cytosolic proteins. However, both GSTU19 and GSTU20 have been found in chloroplast proteomes (chloroKB database), suggesting either their presence in the stroma or at least an external association with the envelope [74]. Moreover, GSTU2 from *Vitis vinifera* was detected at the plasma membrane and its interaction with the plasma membrane-bound HIR protein serves for the export of *trans*-resveratrol [39]. Hence, the proposed roles for GSTUs have to be discussed taking into account these localizations and their documented functional connexion with ABC transporters, notably of the MRP/ABCC family. It is noteworthy that other GSTs may play additional roles in specific compartments because GSTs have usually quite similar ligandin or substrate-binding sites that should also allow the accommodation of tetrapyrroles. In such a coupled chaperone-transport system and considering that GSTUs represent general stress-response factors, are quite abundant and are able to bind and/or to conjugate porphyrin moieties to GSH, they could exert several possible roles that are discussed in the following sections (figure 5).

### (a) Functions in detoxification

GSTUs have well-documented roles in xenobiotic detoxification or sequestration of specialized metabolites and their expression is often strongly regulated during stress conditions [29]. For instance, the TT19/TT12 (GST/ABC transporter) couple is involved in anthocyanin vacuolar sequestration in *A. thaliana* [36]. A similar system may operate in *V. vinifera* where ABCC1 ensures the co-transport of glycosylated anthocyanidin and GSH, confirming that GSH conjugation is not an essential prerequisite for anthocyanin transport [75]. In other respects, these ABCC/MRP transporters are defined as GS-X pumps, being responsible for a large number of transport processes, including the transport of

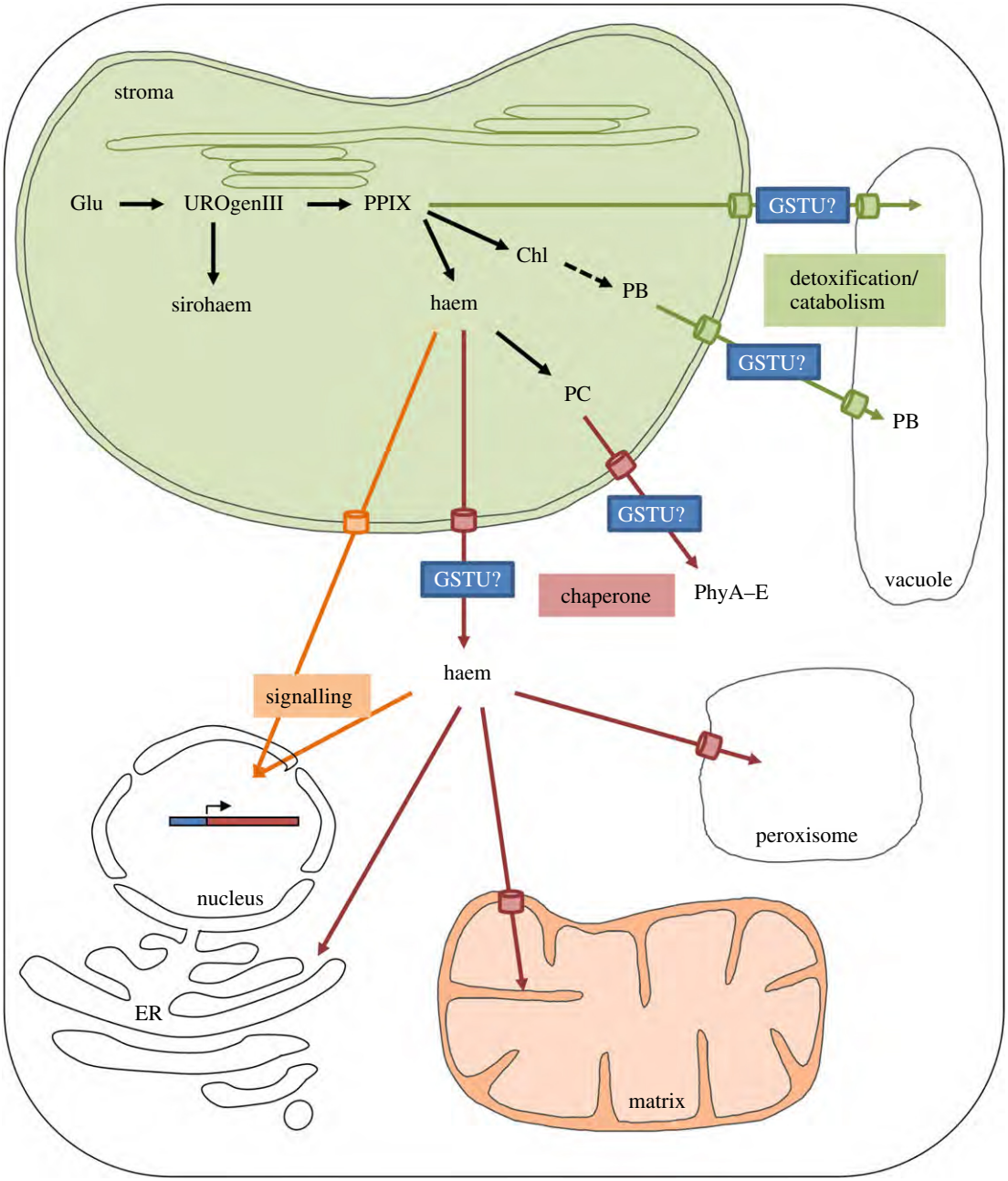



**Figure 5.** Hypothetical model for the involvement of GSTUs in the intracellular trafficking of tetrapyrroles. Unlike sirohaems and chlorophylls that remain in the chloroplastic site of synthesis, other tetrapyrroles translocated from the chloroplasts may react with GSTUs for their detoxification (phyllobilins (PB) and chlorophyll derivatives (Mg-PPIX, Pchlide)), for their trafficking to other subcellular compartments (phytochromobilins (PC) and haems) or for signalling functions (haems). Required transporter proteins are represented, but their identities are so far unknown. Other abbreviations are as follows: Glu, glutamate; UROgen III, uroporphyrinogen III; PPIX, protoporphyrin IX; Chl, chlorophylls; PhyA–E, phytochromes A–E.

glutathione and glucuronide conjugates as well as bile acids in humans. For instance, human MRP1 and MRP2 act synergistically with GSTP1-1 in the detoxification of cytotoxic or genotoxic agents [76,77]. Some tonoplastic *A. thaliana* orthologues (MRP2/ABCC2 and MRP3/ABCC3) transport glutathione conjugates, notably glutathionylated herbicides, but also chlorophyll catabolites, notably a non-fluorescent chlorophyll catabolite (NCC) when expressed in yeast [78,79]. Thus, it is tempting to hypothesize that GSTUs, in association with yet to be identified chloroplastic envelope and tonoplastic transporters, are required as a soluble transport system for the detoxification or vacuolar sequestration of phyllobilins for their subsequent recycling (figure 5).

Another possible role of GSTUs associated with porphyrin binding is to detoxify and thus prevent the action of some reactive porphyrins. First, although tetrapyrrole synthesis and degradation are usually carefully adjusted to the cellular requirements and the potentially toxic intermediates of tetrapyrrole synthesis are usually maintained at low levels in chloroplasts, it may be that some GSTs, either uncharacterized chloroplastic GSTUs or other GSTs, prevent their reactivity via their ligandin function. On the other hand, the concentration threshold of some photosensitizing porphyrins (PPIX and its $Mg^{2+}$ derivatives, including protochlorophyllide) under environmental constraints may overload the antioxidant systems that normally maintain these metabolites in their reduced, non-toxic forms. In such a situation, these reactive porphyrins are released from the chloroplasts and GSTUs may be part of a protective mechanism preventing subsequent oxidative damage by binding or

targeting these molecules to the vacuoles via enzymatic (GSH conjugation) or non-enzymatic (ligandin) reactions.

### (b) Functions as haem/phytochromobilin chaperones

The current knowledge about the mechanisms of intracellular phytochromobilin and haem trafficking in plants remains very limited, as in most eukaryotes. This contrasts with the more extensively characterized bacterial haem transport systems [80]. Conceptually, these tetrapyrrole entities, which are synthesized in plastids, have to be translocated outside this organelle and distributed to cytosolic phytochromes (PHYA–E) in the case of phytochromobilin or to a large number of proteins found in diverse compartments, e.g. mitochondrial matrix, mitochondrial inter-membrane space, nucleus, ER surface, peroxisomes and cytosol in the case of haems (figure 5). As free haem is hydrophobic and cytotoxic, specific molecules and pathways must ensure the efficient targeting of these cofactors to final client haemoproteins. Thinking more specifically about the evolutionary conservation of the haem chaperones and trafficking pathways in eukaryotes, it is expected that the actors are somehow conserved. Indeed, most chaperones and transporters proposed as being involved (HBPs, GAPDH, GSTs, MRP/ABC transporters) are ubiquitous. In plants, considering their capacity to bind haems and to interact with ABC transporters, members of the large GSTU class might well be involved in the cytosolic trafficking of haems, but also phytochromobilins, to final client proteins. Given their abundance, they may serve as reservoir or transient haem storage pools that can become rapidly available in specific physiological circumstances. An extension of this chaperone function would be an involvement in haem signalling functions and notably in the plastid-to-nucleus retrograde signalling in plants (discussed below).

### (c) Functions in plastid-to-nucleus retrograde signalling

The exchange of signals between cellular compartments allows the coordination of development and differentiation, the modulation of metabolic pathways and triggers responses to environmental conditions [5]. For changes occurring in plastids, communication with the nucleus is essential and so-called plastid-to-nucleus retrograde signals operate. A difference is made between a biogenic control that consists of signals associated with chloroplast biogenesis and an operational control that consists of signals originating from developed chloroplasts in mature organs in response to environmental changes. This retrograde signalling is a complex and multi-layered process involving a number of components, i.e. metabolites, reactive oxygen species, proteins or tetrapyrroles, that ultimately regulate nuclear gene expression, notably photosynthesis-associated nuclear genes [5]. The mutant screens developed to understand plastid-to-nucleus signalling mechanisms in *Arabidopsis* notably made use of norflurazon, a herbicide, inhibitor of carotenoid biosynthesis, that blocks chloroplast biogenesis [81]. This led to the isolation of so-called *genomes uncoupled* (*gun*) mutants in which the expression of the *Lhcb* nuclear gene is maintained. Most proteins encoded by the defective genes in the selected loss-of-function mutants are involved in tetrapyrrole metabolism. The *gun2* mutant is modified for the *HO1/HY1* gene, *gun3* for *HY2* and *gun5* for the gene encoding the H subunit of the Mg chelatase (*CHLH*) [81,82]. The *gun4* mutant is affected for a regulator of Mg chelatase activity [83]. An additional gain-of-function mutant overexpressing FC1 (*gun6-1D*) also exhibited a gun phenotype [19]. Different forms of tetrapyrroles (Mg-PPIX, bilin, haem) have been described as signalling molecules in either terrestrial plants or algae, but a role of Mg-PPIX has then been refuted (reviewed in [84,85]). Recent investigations in *Chlamydomonas* using the *hmox1* mutant for the HO pointed to a possible role of bilin as a biogenic retrograde signal that would be essential for photoacclimation and functional chloroplast maintenance during dark-to-light transition. Two mechanisms may operate: a bilin-based, blue-light-sensing system and a bilin-based retrograde signalling pathway [86,87]. The literature in the field is extremely abundant and we refer the readers to recent reviews for more details [5,84,85].

In brief, the current model, at least for the biogenic control, is that there is a positive haem-related signal that is exported from chloroplasts reflecting their developmental status [84]. Among the two ferrochelatases present in *A. thaliana*, only FC1 seems implicated in this signalling pathway [19]. Because FC1 is anchored to the chloroplast envelope and free haem is toxic, we speculate that other proteins participate in the signalling process, i.e. transporter(s) and cytoplasmic and/or nuclear factors/chaperones. In fact, the human mitochondrial ferrochelatase interacts with ABC transporters [88]. Hence, a similar trafficking towards an ABC transporter present in the chloroplast envelope is possible but remains to be characterized. There is also an urgent need to identify whether and which protein(s) would serve as soluble haem or haem-derivative receptors in plastids, cytosol or nucleus for further trafficking. As these factors may be similar to those involved in the trafficking of haems towards haemoproteins (haem chaperone function), proteins belonging to the HBP or GST families are obvious candidates (figure 5). In addition to this positive haem-dependent signal, other signals are produced by chloroplasts in response to environmental variations, and it is proposed that singlet oxygen ($^1O_2$), which can be produced from Mg-porphyrins under specific conditions, initiates a second inhibitory light-dependent signal, repressing both photosynthesis and tetrapyrrole synthesis genes [89]. As for the haem-dependent signal, it is not clear whether $^1O_2$ itself or a derived molecule comes into play. Indeed, $^1O_2$ will react in particular with carotenoids present in PSII, forming degradation products such as β-cyclocitral (β-CC), and with lipids leading to their peroxidation that can further generate toxic reactive carbonyl species. Both types of molecules have signalling functions and a recent study highlighted that β-CC induced the expression of genes encoding proteins implicated in the xenobiotic detoxification response, including many GSTs [90]. Hence, GSTs may also participate in this signalling pathway, independently of their interaction with tetrapyrroles, owing to the binding or GSH conjugation of β-CC or other carotenoid derivatives, to their GSH-dependent peroxidase activity towards peroxidized lipids or to their capacity to conjugate GSH onto reactive carbonyl species to prevent their reactivity.

## 7. Conclusion

Among eukaryotes, plants are unique in having the whole tetrapyrrole synthesis pathway in chloroplasts. Some of the synthesized tetrapyrrole-containing cofactors are required

outside this compartment, but information about their trafficking (binding, transport) is almost nonexistent. By providing experimental data and structural models indicating that GSTUs bind PPIX and haem moieties in their substrate-binding sites, we have speculated about the possible roles played by GSTUs particularly as haem chaperones and as actors of the plastid-to-nucleus retrograde signalling, the topic of this special theme issue. There is now an urgent need to accumulate more biochemical and structural data on diverse GST isoforms, to identify transporters for haems, phytochromobilins or other important intermediates and their connection with GSTs, if any. Even more essential will be to obtain genetic and physiological evidence for the contribution of GSTUs in tetrapyrrole metabolism, despite the drawback of having a multigene family.

Data accessibility. Data will be publicly available. The material and methods used are described in the electronic supplementary files.

Authors' contributions. E.S.-G. and J.-M.G. performed the experiments designed together with A.H. and N.R. M.S. carried out the structural modelling analyses. All authors participated in the writing of the manuscript.

Competing interests. We declare we have no competing interests.

Funding. A.H., J.-M.G. and N.R. are supported by the French National Research Agency (grant nos ANR-11-LABX-0002-01, ANR-17-CE20-0008-01). M.S. salary was funded by a grant from Lorraine Université Excellence.

Acknowledgements. We thank Fabien Lachaud and François Dupire from the mass spectrometry facility platform.

## References

1. Tanaka R, Tanaka A. 2007 Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 321–346. (doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105448)
2. Brzezowski P, Richter AS, Grimm B. 2015 Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae. *Biochim. Biophys. Acta* **1847**, 968–985. (doi:10.1016/j.bbabio.2015.05.007)
3. Richter AS, Grimm B. 2013 Thiol-based redox control of enzymes involved in the tetrapyrrole biosynthesis pathway in plants. *Front. Plant Sci.* **4**, 371. (doi:10.3389/fpls.2013.00371)
4. Kuai B, Chen J, Hörtensteiner S. 2018 The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown. *J. Exp. Bot.* **69**, 751–767. (doi:10.1093/jxb/erx322)
5. Kleine T, Leister D. 2016 Retrograde signaling: organelles go networking. *Biochim. Biophys. Acta* **1857**, 1313–1325. (doi:10.1016/j.bbabio.2016.03.017)
6. Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J. 2003 Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* **421**, 79–83. (doi:10.1038/nature01204)
7. Hanna DA, Harvey RM, Martinez-Guzman O, Yuan X, Chandrasekharan B, Raju G, Outten FW, Hamza I, Reddi AR. 2016 Heme dynamics and trafficking factors revealed by genetically encoded fluorescent heme sensors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, 7539–7544. (doi:10.1073/pnas.1523802113)
8. Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N, Masuda M, Yokota A, Lagarias JC. 2001 The Arabidopsis *HY2* gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell* **13**, 425–436. (doi:10.1105/tpc.13.2.425)
9. Gisk B, Yasui Y, Kohchi T, Frankenberg-Dinkel N. 2010 Characterization of the haem oxygenase protein family in *Arabidopsis thaliana* reveals a diversity of functions. *Biochem. J.* **425**, 425–434. (doi:10.1042/BJ20090775)
10. Davis SJ, Kurepa J, Vierstra RD. 1999 The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 6541–6546. (doi:10.1073/pnas.96.11.6541)
11. Muramoto T, Tsurui N, Terry MJ, Yokota A, Kohchi T. 2002 Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required for phytochrome chromophore synthesis. *Plant Physiol.* **130**, 1958–1966. (doi:10.1104/pp.008128)
12. Emborg TJ, Walker JM, Noh B, Vierstra RD. 2006 Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **140**, 856–868. (doi:10.1104/pp.105.074211)
13. Davis SJ, Bhoo SH, Durski AM, Walker JM, Vierstra RD. 2001 The heme-oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. *Plant Physiol.* **126**, 656–669. (doi:10.1104/pp.126.2.656)
14. Taketani S, Adachi Y, Kohno H, Ikehara S, Tokunaga R, Ishii T. 1998 Molecular characterization of a newly identified heme-binding protein induced during differentiation of urine erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 31 388–31 394. (doi:10.1074/jbc.273.47.31388)
15. Vincent SH, Muller-Eberhard U. 1985 A protein of the Z class of liver cytosolic proteins in the rat that preferentially binds heme. *J. Biol. Chem.* **260**, 14 521–14 528.
16. Sweeny EA *et al.* 2018 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a chaperone that allocates labile heme in cells. *J. Biol. Chem.* **293**, 14 557–14 568. (doi:10.1074/jbc.RA118.004169)
17. Takahashi S, Ogawa T, Inoue K, Masuda T. 2008 Characterization of cytosolic tetrapyrrole-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 1216–1224. (doi:10.1039/b802588f)
18. Lee H-J, Mochizuki N, Masuda T, Buckhout TJ. 2012 Disrupting the bimolecular binding of the haem-binding protein 5 (AtHBP5) to haem oxygenase 1 (HY1) leads to oxidative stress in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **63**, 5967–5978. (doi:10.1093/jxb/ers242)
19. Woodson JD, Perez-Ruiz JM, Chory J. 2011 Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants. *Curr. Biol.* **21**, 897–903. (doi:10.1016/j.cub.2011.04.004)
20. Espinas NA, Kobayashi K, Sato Y, Mochizuki N, Takahashi K, Tanaka R, Masuda T. 2016 Allocation of heme is differentially regulated by ferrochelatase isoforms in *Arabidopsis* cells. *Front. Plant Sci.* **7**, 1326. (doi:10.3389/fpls.2016.01326)
21. Scharfenberg M, Mittermayr L, Von Roepenack-Lahaye E, Schlicke H, Grimm B, Leister D, Kleine T. 2015 Functional characterization of the two ferrochelatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **38**, 280–298. (doi:10.1111/pce.12248)
22. Fan T, Roling L, Meiers A, Brings L, Ortega-Rodés P, Hedtke B, Grimm B. 2019 Complementation studies of the Arabidopsis *fc1* mutant substantiate essential functions of ferrochelatase 1 during embryogenesis and salt stress. *Plant Cell Environ.* **42**, 618–632. (doi:10.1111/pce.13448)
23. Roper JM, Smith AG. 1997 Molecular localisation of ferrochelatase in higher plant chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **246**, 32–37. (doi:10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00032.x)
24. Severance S, Hamza I. 2009 Trafficking of heme and porphyrins in Metazoa. *Chem. Rev.* **109**, 4596–4616. (doi:10.1021/cr9001116)
25. Vanhee C, Zapotoczny G, Masquelier D, Ghislain M, Batoko H. 2011 The *Arabidopsis* multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism. *Plant Cell* **23**, 785–805. (doi:10.1105/tpc.110.081570)
26. Balsemão-Pires E, Jaillais Y, Olson BJSC, Andrade LR, Umen JG, Chory J, Sachetto-Martins G. 2011 The *Arabidopsis* translocator protein (AtTSPO) is regulated at multiple levels in response to salt stress and perturbations in tetrapyrrole metabolism. *BMC Plant Biol.* **11**, 108. (doi:10.1186/1471-2229-11-108)
27. Morel M, Meux E, Mathieu Y, Thuillier A, Chibani K, Harvengt L, Jacquot J-P, Gelhaye E. 2013 Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microb. Biotechnol.* **6**, 248–263. (doi:10.1111/1751-7915.12015)
28. Plomion C *et al.* 2018 Oak genome reveals facets of long lifespan. *Nat. Plants* **4**, 440–452. (doi:10.1038/s41477-018-0172-3)
29. Sylvestre-Gonon E, Law SR, Schwartz M, Robe K, Keech O, Didierjean C, Dubos C, Rouhier N, Hecker

A. 2019 Functional, structural and biochemical features of plant serinyl-glutathione transferases. *Front. Plant Sci.* **10**, 608. (doi:10.3389/fpls.2019.00608)

30. Lallement P-A, Brouwer B, Keech O, Hecker A, Rouhier N. 2014 The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. *Front. Pharmacol.* **5**, 192. (doi:10.3389/fphar.2014.00192)
31. Cummins I, Dixon DP, Freitag-Pohl S, Skipsey M, Edwards R. 2011 Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab. Rev.* **43**, 266–280. (doi:10.3109/03602532.2011.552910)
32. Ahmad L, Rylott EL, Bruce NC, Edwards R, Grogan G. 2017 Structural evidence for *Arabidopsis* glutathione transferase AtGSTF2 functioning as a transporter of small organic ligands. *FEBS OpenBio* **7**, 122–132. (doi:10.1002/2211-5463.12168)
33. Dixon DP, Skipsey M, Edwards R. 2010 Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **71**, 338–350. (doi:10.1016/j.phytochem.2009.12.012)
34. Su T, Xu J, Li Y, Lei L, Zhao L, Yang H, Feng J, Liu G, Ren D. 2011 Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**, 364–380. (doi:10.1105/tpc.110.079145)
35. Piślewska-Bednarek M *et al.* 2018 Glutathione transferase U13 functions in pathogen-triggered glucosinolate metabolism. *Plant Physiol.* **176**, 538–551. (doi:10.1104/pp.17.01455)
36. Kitamura S, Shikazono N, 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)
37. Sun Y, Li H, Huang J-R. 2012 *Arabidopsis* TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts. *Mol. Plant* **5**, 387–400. (doi:10.1093/mp/ssr110)
38. Dixon DP, Edwards R. 2018 Protein-ligand fishing *in planta* for biologically active natural products using glutathione transferases. *Front. Plant Sci.* **9**, 1659. (doi:10.3389/fpls.2018.01659)
39. Martínez-Márquez A, Martínez-Esteso MJ, Vilella-Antón MT, Sellés-Marchart S, Morante-Carriel JA, Hurtado E, Palazon J, Bru-Martínez R. 2017 A tau class glutathione-S-transferase is involved in trans-resveratrol transport out of grapevine cells. *Front. Plant Sci.* **8**, 1457. (doi:10.3389/fpls.2017.01457)
40. Dixon DP, Edwards R. 2009 Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* **284**, 21 249–21 256. (doi:10.1074/jbc.M109.020107)
41. Dixon DP, Lapthorn A, Madesis P, Mudd EA, Day A, Edwards R. 2008 Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* **283**, 20 268–20 276. (doi:10.1074/jbc.M802026200)
42. Lederer B, Böger P. 2003 Binding and protection of porphyrins by glutathione S-transferases of *Zea mays* L. *Biochim. Biophys. Acta* **1621**, 226–233. (doi:10.1016/S0304-4165(03)00073-4)
43. Lederer B, Böger P. 2005 A ligand function of glutathione S-transferase. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **60**, 166–171.
44. Ketley JN, Habig WH, Jakoby WB. 1975 Binding of nonsubstrate ligands to the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **250**, 8670–8673.
45. Boyer TD. 1986 Covalent labeling of the nonsubstrate ligand-binding site of glutathione S-transferases with bilirubin-Woodward's reagent K. *J. Biol. Chem.* **261**, 5363–5367.
46. Boyer TD, Vessey DA. 1987 Inhibition of human cationic glutathione S-transferase by nonsubstrate ligands. *Hepatology* **7**, 843–848. (doi:10.1002/hep.1840070509)
47. Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jensson H, Tahir MK, Warholm M, Jörnvall H. 1985 Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**, 7202–7206. (doi:10.1073/pnas.82.21.7202)
48. Harwaldt P, Rahlfs S, Becker K. 2002 Glutathione S-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: characterization of a potential drug target. *Biol. Chem.* **383**, 821–830. (doi:10.1515/BC.2002.086)
49. Hiller N, Fritz-Wolf K, Deponte M, Wende W, Zimmermann H, Becker K. 2006 *Plasmodium falciparum* glutathione S-transferase—structural and mechanistic studies on ligand binding and enzyme inhibition. *Protein Sci.* **15**, 281–289. (doi:10.1110/ps.051891106)
50. Al-Qattan MN, Mordi MN, Mansor SM. 2016 Assembly of ligands interaction models for glutathione-S-transferases from *Plasmodium falciparum*, human and mouse using enzyme kinetics and molecular docking. *Comput. Biol. Chem.* **64**, 237–249. (doi:10.1016/j.compbiolchem.2016.07.007)
51. Lisewski AM *et al.* 2014 Supergenomic network compression and the discovery of EXP1 as a glutathione transferase inhibited by artesunate. *Cell* **158**, 916–928. (doi:10.1016/j.cell.2014.07.011)
52. Yamada T, Takusagawa F. 2007 $PGH_2$ degradation pathway catalyzed by GSH heme complex bound microsomal prostaglandin $E_2$ synthase type 2: the first example of a dual-function enzyme. *Biochemistry* **46**, 8414–8424. (doi:10.1021/bi700605m)
53. Caccuri AM, Aceto A, Piemonte F, Di Ilio C, Rosato N, Federici G. 1990 Interaction of haemin with placental glutathione transferase. *Eur. J. Biochem.* **189**, 493–497. (doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15514.x)
54. Plancarte A, Romero JR, Nava G, Reyes H, Hernández M. 2014 Evaluation of the non-catalytic binding function of Ts26GST a glutathione transferase isoform of *Taenia solium*. *Exp. Parasitol.* **138**, 63–70. (doi:10.1016/j.exppara.2014.02.004)
55. Liebau E *et al.* 2005 Cooperativity and pseudo-cooperativity in the glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **280**, 26 121–26 128. (doi:10.1074/jbc.M503889200)
56. Oakley A. 2011 Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.* **43**, 138–151. (doi:10.3109/03602532.2011.558093)
57. Senjo M, Ishibashi T, Imai Y. 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. *J. Biol. Chem.* **260**, 9191–9196.
58. Paiva-Silva GO, Cruz-Oliveira C, Nakayasu ES, Maya-Monteiro CM, Dunkov BC, Masuda H, Almeida IC, Oliveira PL. 2006 A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 8030–8035. (doi:10.1073/pnas.0602224103)
59. Atamna H, Ginsburg H. 1995 Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 24 876–24 883. (doi:10.1074/jbc.270.42.24876)
60. Dubois VL, Platel DF, Pauly G, Tribouley-Duret J. 1995 *Plasmodium berghei*: implication of intracellular glutathione and its related enzyme in chloroquine resistance in vivo. *Exp. Parasitol.* **81**, 117–124. (doi:10.1006/expr.1995.1099)
61. Singh BR, Shaw RW. 1988 Selective inhibition of oat glutathione-S-transferase activity by tetrapyrroles. *FEBS Lett.* **234**, 379–382. (doi:10.1016/0014-5793(88)80120-0)
62. Zachariah VT, Walsh-Sayles N, Singh BR. 2000 Isolation, purification, and characterization of glutathione S-transferase from oat (*Avena sativa*) seedlings. *J. Protein Chem.* **19**, 425–430. (doi:10.1023/a:1026513528654)
63. Dixon DP, McEwen AG, Lapthorn AJ, Edwards R. 2003 Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* **278**, 23 930–23 935. (doi:10.1074/jbc.M303620200)
64. Thom R, Cummins I, Dixon DP, Edwards R, Cole DJ, Lapthorn AJ. 2002 Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochemistry* **41**, 7008–7020. (doi:10.1021/bi015964x)
65. Valenzuela-Chavira I *et al.* 2017 Insights into ligand binding to a glutathione S-transferase from mango: structure, thermodynamics and kinetics. *Biochimie* **135**, 35–45. (doi:10.1016/j.biochi.2017.01.005)
66. Axarli I, Dhavala P, Papageorgiou AC, Labrou NE. 2009 Crystallographic and functional characterization of the fluorodifen-inducible glutathione transferase from *Glycine max* reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site. *J. Mol. Biol.* **385**, 984–1002. (doi:10.1016/j.jmb.2008.10.084)
67. Skopelitou K, Muleta AW, Papageorgiou AC, Chronopoulou E, Labrou NE. 2015 Catalytic features and crystal structure of a tau class glutathione transferase from *Glycine max* specifically upregulated in response to soybean mosaic virus infections. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*

**1854**, 166–177. (doi:10.1016/j.bbapap.2014.11.008)

68. Yang Q, Han X-M, Gu J-K, Liu Y-J, Yang M-J, Zeng Q-Y. 2019 Functional and structural profiles of GST gene family from three *Populus* species reveal the sequence-function decoupling of orthologous genes. *New Phytol.* **221**, 1060–1073. (doi:10.1111/nph.15430)
69. Tossounian M-A *et al.* 2018 Disulfide bond formation protects *Arabidopsis thaliana* glutathione transferase tau 23 from oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subjects* **1862**, 775–789. (doi:10.1016/j.bbagen.2017.10.007)
70. Jurrus E *et al.* 2018 Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci.* **27**, 112–128. (doi:10.1002/pro.3280)
71. Chen X, Pu H, Wang X, Long W, Lin R, Liu L. 2015 Crystal structures of GUN4 in complex with porphyrins. *Mol. Plant* **8**, 1125–1127. (doi:10.1016/j.molp.2015.04.013)
72. Schwartz M *et al.* 2018 Molecular recognition of wood polyphenols by phase II detoxification enzymes of the white rot *Trametes versicolor*. *Sci. Rep.* **8**, 8472. (doi:10.1038/s41598-018-26601-3)
73. Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ, Edwards R. 2009 Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *J. Exp. Bot.* **60**, 1207–1218. (doi:10.1093/jxb/ern365)
74. Gloaguen P *et al.* 2017 ChloroKB: a web application for the integration of knowledge related to chloroplast metabolic network. *Plant Physiol.* **174**, 922–934. (doi:10.1104/pp.17.00242)
75. Francisco RM *et al.* 2013 ABCC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-glucosides. *Plant Cell* **25**, 1840–1854. (doi:10.1105/tpc.112.102152)
76. Paumi CM, Ledford BG, Smitherman PK, Townsend AJ, Morrow CS. 2001 Role of multidrug resistance protein 1 (MRP1) and glutathione S-transferase A1-1 in alkylating agent resistance. Kinetics of glutathione conjugate formation and efflux govern differential cellular sensitivity to chlorambucil versus melphalan toxicity. *J. Biol. Chem.* **276**, 7952–7956. (doi:10.1074/jbc.M009400200)
77. Morrow CS, Smitherman PK, Townsend AJ. 2000 Role of multidrug-resistance protein 2 in glutathione S-transferase P1-1-mediated resistance to 4-nitroquinoline 1-oxide toxicities in HepG2 cells. *Mol. Carcinog.* **29**, 170–178. (doi:10.1002/1098-2744(200011)29:3<170::AID-MC6>3.0.CO;2-W)
78. Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hörtensteiner S, Matile P, Amrhein N, Martinoia E. 1998 An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.* **13**, 773–780. (doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00076.x)
79. Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hortensteiner S, Martinoia E, Rea PA. 1998 AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with Atmrp1. *Plant Cell* **10**, 267–282. (doi:10.1105/tpc.10.2.267)
80. Huang W, Wilks A. 2017 Extracellular heme uptake and the challenge of bacterial cell membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 799–823. (doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014214)
81. Susek RE, Ausubel FM, Chory J. 1993 Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear *CAB* and *RBCS* gene expression from chloroplast development. *Cell* **74**, 787–799. (doi:10.1016/0092-8674(93)90459-4)
82. Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani A, Chory J. 2001 *Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5)* mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 2053–2058. (doi:10.1073/pnas.98.4.2053)
83. Larkin RM, Alonso JM, Ecker JR, Chory J. 2003 GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science* **299**, 902–906. (doi:10.1126/science.1079978)
84. Terry MJ, Smith AG. 2013 A model for tetrapyrrole synthesis as the primary mechanism for plastid-to-nucleus signaling during chloroplast biogenesis. *Front. Plant Sci.* **4**, 14. (doi:10.3389/fpls.2013.00014)
85. Larkin RM. 2016 Tetrapyrrole signaling in plants. *Front. Plant Sci.* **7**, 1586. (doi:10.3389/fpls.2016.01586)
86. Duanmu D *et al.* 2013 Retrograde bilin signaling enables *Chlamydomonas* greening and phototrophic survival. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 3621–3626. (doi:10.1073/pnas.1222375110)
87. Wittkopp TM *et al.* 2017 Bilin-dependent photoacclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **29**, 2711–2726. (doi:10.1105/tpc.17.00149)
88. Maio N, Kim KS, Holmes-Hampton G, Singh A, Rouault TA. 2019 Dimeric ferrochelatase bridges ABCB7 and ABCB10 homodimers in an architecturally defined molecular complex required for heme biosynthesis. *Haematologica* **104**, 1756–1767. (doi:10.3324/haematol.2018.214320)
89. Page MT, McCormac AC, Smith AG, Terry MJ. 2017 Singlet oxygen initiates a plastid signal controlling photosynthetic gene expression. *New Phytol.* **213**, 1168–1180. (doi:10.1111/nph.14223)
90. D'Alessandro S, Ksas B, Havaux M. 2018 Decoding β-cyclocitral-mediated retrograde signaling reveals the role of a detoxification response in plant tolerance to photooxidative stress. *Plant Cell* **30**, 2495–2511. (doi:10.1105/tpc.18.00578)

**Supplementary material associated to the manuscript " Is there a role for tau glutathione transferases in tetrapyrrole metabolism and retrograde signaling in plants? " by Sylvestre-Gonon et al.**

**"Retrograde signalling" theme issue of Philosophical Transactions of the Royal Society B**

## Methods

### *Cloning, protein expression and purification*

The sequences coding for GSTU8 (At3g09270), GSTU16 (At1g59700), GSTU19 (At1g78380) and GSTU22 (At1g78340) from *Arabidopsis thaliana* and GSTU1 from *Zea mays* were cloned by PCR into pET-26b plasmids for the production of C-terminal his-tagged proteins. The cloning of Arabidopsis GAPC1 (At3g04120) in pET28a was described previously [1]. Expression was performed using the *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) pLysS strain (Novagen). The cells were classically grown at 37°C in LB medium supplemented with kanamycin (50 $\mu g.ml^{-1}$) and chloramphenicol (34 $\mu g.ml^{-1}$). When the cell culture reached an $OD_{600nm}$ of 0.8, protein expression was induced with 0.1 mM IPTG and cells were grown for a further 4 h at this temperature. Alternatively, to boost bacterial heme synthesis, 0.25 mM $FeCl_3$ and 1.5 mM 5-aminolevulinic acid were added in the medium 2 h before the induction of protein expression with 0.1 mM IPTG performed when the cell culture reached an $OD_{600nm}$ of 0.8. In this case, the cells were additionally grown for 18 h at 30°C. In all cases, 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 (two times for 1 min with an interval of 1 min). The cell extract was then centrifuged at 42,000 g for 30 min at 4°C to remove cellular debris and aggregated proteins. The C-terminal $His_6$-tagged proteins were purified as follows: 10 mM imidazole was added in the fraction containing soluble proteins before loading onto a Ni-NTA ($Ni^{2+}$-nitrilotriacetate)–agarose resin (Qiagen). After a washing step with lysis buffer supplemented with 20 mM imidazole, the proteins were eluted using lysis buffer containing 250 mM imidazole. The fractions of interest were pooled, concentrated by ultrafiltration (Vivaspin turbo 15, Sartorius) then injected onto a gel filtration HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) column connected to an ÄKTA purifier FPLC system (GE Healthcare) and eluted with 30 mM Tris-HCl pH 8.0 and 200 mM NaCl buffer. Again, fractions of interest were pooled, concentrated by ultrafiltration (Vivaspin, Sartorius) and stored in 30 mM Tris-HCl pH 8.0 and 200 mM NaCl buffer at -20°C until use. The homogeneity of the

purified proteins was checked by SDS/PAGE. The concentrations of apo-proteins were determined by measuring the absorbance at 280 nm and using theoretical molar absorption coefficients of 46410, 36340, 44920 $M^{-1}.cm^{-1}$ for AtGSTU8, AtGSTU16, AtGSTU19 respectively, and of 40910 $M^{-1}.cm^{-1}$ for AtGSTU22, ZmGSTU1 and AtGAPC1 as deduced from the amino acid sequences. The concentrations of holo-proteins were determined using a bicinchoninic acid assay (Interchim, France). For electrospray ionization mass spectrometry analyses, AtGSTU8 was desalted onto a PD MidiTrap G-25 column (GE Healthcare) against 30 mM Tris-HCl pH 8.0 and analyzed as described [2]. All proteins were also analyzed after a liquid chromatography separation using the same mass spectrometry equipment.

***Analytical gel filtration***

100 µg of AtGSTU8 (final concentration of 3 µM) were incubated or not with 100 µM of PPIX during 1 h in 250 µL of 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl buffer. Samples were centrifuged at 13,400 rpm (minispin, Eppendorf) during 5 min at room temperature and then injected onto a gel filtration 10/300 GL Superdex 200 (GE Healthcare) column connected to an ÄKTA purifier FPLC system (GE Healthcare) and eluted with 30 mM Tris-HCl pH 8.0 and 200 mM NaCl buffer. Data processing was carried out with Unicorn 5.20 software.

***Intrinsic fluorescence of tryptophan***

Fluorescence measurements were performed on a Cary Eclipse (Varian) fluorescence spectrophotometer. The binding affinity of enzymes for porphyrins was determined by tryptophan fluorescence quenching titrations. The excitation wavelength was set at 290 nm, and the emission recorded between 300 and 400 nm. Titration was carried out in 30 mM of Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA buffer with 5 µM of protein and increasing concentrations of PPIX from 0 to 150 µM and of hemin and hematin from 0 to 100 µM. To determine the dissociation constant ($K_d$) of GSTs for porphyrins, the following equation (Equation 1) was applied using GraphPad Prism 6.0 software:

$$\Delta F / F_{max} = \frac{B_{max} \times [S]}{K_d + [S]}$$

where $\Delta F/F_{max}$ ratio represents the changes in fluorescence intensity relative to the initial value (*i.e.* without ligand) after addition of PPIX at a concentration [S], $B_{max}$ is the maximum number of specific binding sites and $K_d$ corresponds to the dissociation constant.

*Molecular docking study*

In order to dock PPIX onto AtGSTU23, the coordinates of the ligand (ZINC4208846) from the ZINC15 database [3], together with the coordinates of AtGSTU23 crystal structure in complex with GSH (pdb code 6EP7) were prepared for docking with AutoDock Tools [4]. A search box of 40 $Å^3$ was defined at the center of the active site. Docking calculation was performed with AutoDock Vina [5] using default parameters and side chains lining the active site were set as flexible. The predicted PPIX binding poses returned by the software were visualized with Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC). The most probable binding pose of PPIX has a configuration such that the negatively charged propionic groups are oriented toward the solvent whereas the tetrapyrrole ring sits in a hydrophobic pocket. The figures 3 and 4 were prepared with Pymol.

**Figure S1. Unrooted phylogenic tree showing that the selected AtGSTUs belong to the three major clades.**

The sequences used for this analysis are the GSTUs identified in *Arabidopsis thaliana* as well as *Zea mays* GSTU1. Sequences were aligned and poorly aligned positions and divergent regions removed using seaview software [6]. The phylogenetic tree was then constructed with BioNJ [7] 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 1000 replications. The scale marker represents 0.1 substitutions per residue.

**Figure S2. UV-visible absorption spectra of recombinant AtGSTU8, AtGSTU16, AtGSTU19, AtGSTU22 and ZmGSTU1.**

All these proteins were expressed in *E. coli* using a medium supplemented with $FeCl_3$ and aminolevulinic acid, purified in a single IMAC step and dialyzed before recording a UV-Visible absorption spectrum between 250 and 650 nm. AtGSTU8 is in blue, AtGSTU16 in red, AtGSTU19 in green, AtGSTU22 in violet and ZmGSTU1 in orange. In the inset, focus on the 350-450 nm region showing differences in the absorbance band maxima ($\lambda_{max}$).

**Figure S3. Electrospray ionization (ESI) mass-to-charge ratio (m/z) spectra of AtGSTU8, AtGSTU16, AtGSTU19 and ZmGSTU1 focusing on their co-purified metabolite obtained using liquid chromatography coupled to a Bruker microTOF-Q spectrometer.**

A molecule with a molecular mass of 616.1604 or 616.1861 Da corresponding to a heme b was detected for AtGSTU8 and AtGSTU16 respectively. A molecule with a molecular mass of

609.2541 or 609.2816 Da corresponding to harderoporphyrin was detected for AtGSTU19 and ZmGSTU1 respectively. Intensity of the signal is represented as arbitrary units (AU).

**Figure S4. Multiple sequence alignment of GSTUs from *Arabidopsis thaliana*.**

This multiple alignment was performed with ClustalW implemented in BioEdit. Proteins that present biochemical evidence for PPIX-binding properties are highlighted in magenta including *Zm*GSTU1. The numbering is based on AtGSTU1 sequence. The structure of AtGSTU23 used for docking study is underlined. Putative catalytic signature is coloured in red. Conserved residues are highlighted in yellow and their positions are indicated below the alignment by the symbols G, H and * for residues of the glutathione binding site, of the hydrophobic site and putative PPIX-binding residues identified through docking studies, respectively (this work and [8]).

| Class & symbol | | Occurrence | Oligomeric state | Catalytic residue | Catalytic and non-catalytic activities | Interaction with porphyrin moieties |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Alpha | A | Mammals, birds, fishes | Dimer | Tyr | GSH-conjugation, peroxide reduction, isomerase | Yes, ligandin/catalytic sites |
| Beta | B | Bacteria | Dimer | Cys* | GSH-conjugation, thiol transferase | |
| Chi | C | Bacteria | Dimer | ? | GSH-conjugation, thiol transferase | |
| Delta | D | Insects | Dimer | Ser | GSH-conjugation | |
| Epsilon | E | Insects | Dimer | Ser | Peroxide reduction | |
| *Phi* | *F* | *Plants, fungi, bacteria, protists* | *Dimer* | *Ser* | *GSH-conjugation, peroxide reduction, isomerase, ligandin, deglutathionylation** | *Yes, ligandin/catalytic sites* |
| Eta | H | Bacteria | Dimer | Arg | GSH-conjugation, peroxide reduction | |
| *Hemerythrin* | *H* | *Plants* | *?* | *Cys* | *?* | |
| *Iota* | *I* | *Plants* | *?* | *Cys* | *?* | |
| Kappa | K | Mammals, bacteria | Dimer | Ser | GSH-conjugation, peroxide reduction, ligandin | |
| *Lambda* | *L* | *Plants* | *Monomer* | *Cys* | *Thiol transferase, deglutathionylation, ligandin* | |
| Mu | M | Mammals, arthropodes, protozoa, cestoda | Dimer | Tyr | GSH-conjugation, peroxide reduction, isomerase, ligandin | Yes, ligandin site |
| *Nu/Ure2p* | *N* | *Plants, fungi, nematodes, bacteria* | *Dimer* | *Tyr/Asn* | *GSH-conjugation, thiol-transferase, peroxide reduction, ligandin* | |
| Omega | O | Mammals, fungi, insects | Dimer | Cys/Ser | GSH-conjugation, thiol transferase, dehydroascorbate (DHA) reductase, ion channel modulation | |
| Pi | P | Mammals, nematodes | Dimer | Tyr | GSH-conjugation, peroxide reduction, isomerase, NO transport/scavenging | Yes, catalytic site |
| Rho | R | Fishes, mollusca | Dimer | Ser | GSH-conjugation | |
| Sigma (including PGDS, PfGST) | S | Animals, insects, algae, trematodes, apicomplexa | Dimer | Tyr | GSH-conjugation, peroxide reduction, isomerase, prostaglandin synthesis | Yes, ligandin/catalytic sites |
| *Theta* | *T* | *Animals, plants, insects, algae, bacteria* | *Dimer* | *Ser* | *GSH-conjugation, peroxide reduction* | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Tau* | *U* | *Plants* | *Dimer* | *Ser* | *GSH-conjugation, peroxide reduction, ligandin* | *Yes, ligandin/catalytic sites* |
| *GHR (Xi)* | - | *Plants, fungi, bacteria, archaea* | *Dimer* | *Cys* | *DHA reductase, thiol transferase, deglutathionylation* | |
| *Zeta* | *Z* | *Animals, plants, insects, fungi, bacteria* | *Dimer* | *Ser* | *GSH-conjugation, peroxide reduction, isomerase* | |
| CLIC | - | Invertebrates, mammals, fishes | Dimer/Monomer | Cys/Asp | Ligandin, ion channel formation and modulation | |
| *DHAR* | - | *Plants* | *Monomer* | *Cys* | *DHA reductase, thiol transferase, deglutathionylation* | |
| *EF1B* | - | *Animals, plants, fungi* | *Monomer/Dimer* | *?* | *GSH-conjugation, protein translation* | |
| Grx2 | - | Bacteria | Monomer | Cys | GSH-conjugation, esterase, thiol-transferase | |
| GSTFuA (GTE) | | Fungi | Dimer | Ser/Gly | GSH-conjugation, transferase, ligandin, esterase | |
| GTT | - | Fungi | Dimer | ? | GSH-conjugation, peroxide reduction | |
| MAPEG (PfEXP1) | | Animals, plants, fungi, bacteria, apicomplexa | Trimer | ? | GSH-conjugation, peroxide reduction | Yes, *catalytic site* |
| *mPGES2* | - | *Mammals, plants, birds, fishes* | *Dimer* | *Cys* | *Isomerase* | *Yes, catalytic site* |
| *Metaxin* | | *Animals, Fungi, Plants* | *?* | *Ser/Cys* | *Membrane protein import in mitochondria* | |
| SSPA | - | Bacteria (*Francisella*) | Dimer | Asp ? | Ligandin ? | |
| *TCHQD* | - | *Plants, bacteria* | *Dimer* | *Ser* | *Dehalogenase* | |

**Table S1. Occurrence of GST classes and associated properties.**

The classes found in plants are in italics. Note that Prostaglandin-D synthases (PGDS) and *Plasmodium falciparum* GST (PfGST) have been grouped with sigma class GSTs based on their sequence similarity. Noteworthy, the Iota and Xi nomenclature was also used for defining some atypical GSTs in *Aedes aegypti* [9] but they are different from those indicated in this table. Although structurally divergent, MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) proteins have been listed here because they exhibit GST-type activities and a

MAPEG-like from *P. falciparum* (EXP1) was shown to bind heme. The conclusions shown in the column "interaction with porphyrin moieties" are essentially derived from the enzymatic studies listed in Table 1.

*Both serine and cysteine residues are present in the active site signature of some members which explain the existence of both GSH-conjugation and thiol transferase/deglutathionylation activities. This table was updated from a previous version [10].

## References


1. Bedhomme M, Adamo M, Marchand CH, Couturier J, Rouhier N, Lemaire SD, Zaffagnini M, Trost P. 2012 Glutathionylation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the model plant *Arabidopsis thaliana* is reversed by both glutaredoxins and thioredoxins in vitro. *Biochem. J.* **445**, 337–347. (doi:10.1042/BJ20120505)

2. Koh CS *et al.* 2008 An atypical catalytic mechanism involving three cysteines of thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **283**, 23062–23072. (doi:10.1074/jbc.M802093200)

3. Sterling T, Irwin JJ. 2015 ZINC 15--Ligand Discovery for Everyone. *J Chem Inf Model* **55**, 2324–2337. (doi:10.1021/acs.jcim.5b00559)

4. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. 2009 AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **30**, 2785–2791. (doi:10.1002/jcc.21256)

5. Trott O, Olson AJ. 2010 AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* **31**, 455–461. (doi:10.1002/jcc.21334)

6. Gouy M, Guindon S, 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)

7. 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)

8. Dixon DP, Lapthorn A, Madesis P, Mudd EA, Day A, Edwards R. 2008 Binding and Glutathione Conjugation of Porphyrinogens by Plant Glutathione Transferases. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 20268–20276. (doi:10.1074/jbc.M802026200)

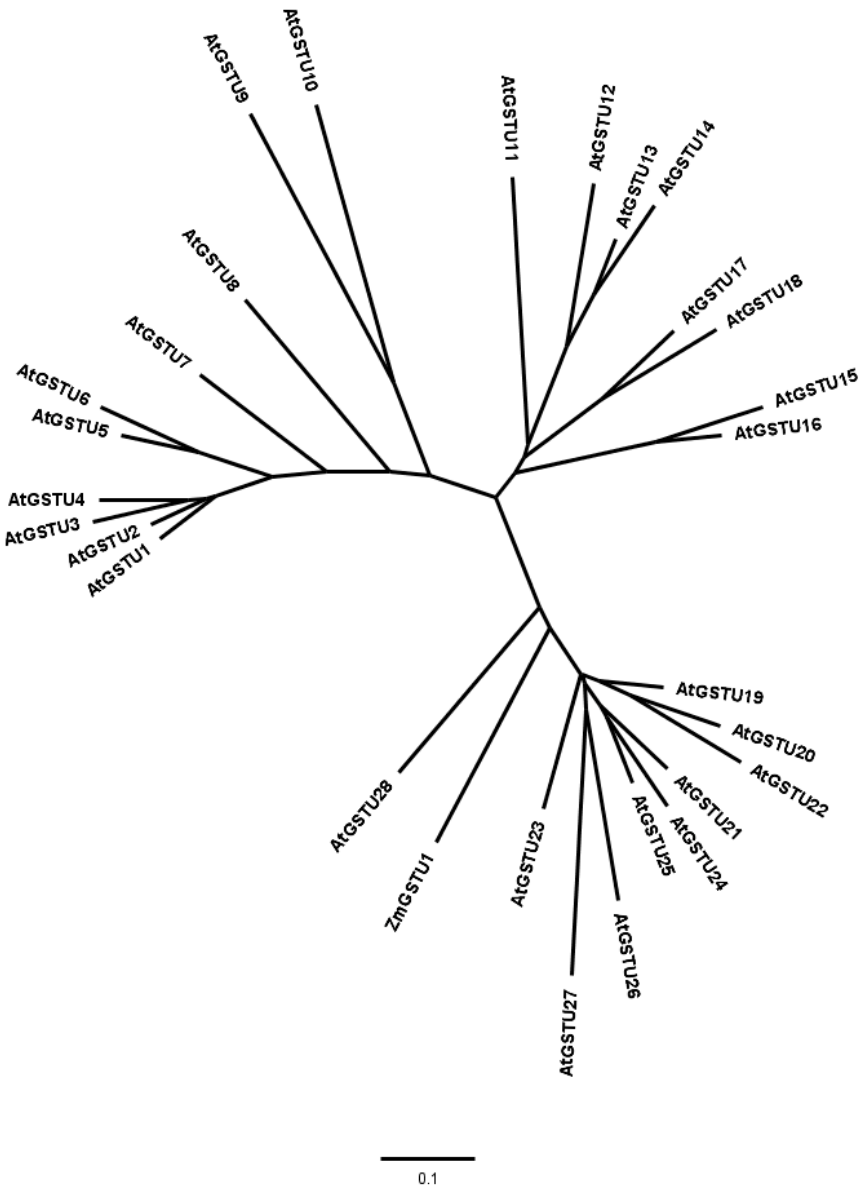

AtGSTU9
AtGSTU10
AtGSTU11
AtGSTU12
AtGSTU13
AtGSTU14
AtGSTU8
AtGSTU17
AtGSTU18
AtGSTU7
AtGSTU6
AtGSTU15
AtGSTU5
AtGSTU16
AtGSTU4
AtGSTU3
AtGSTU2
AtGSTU1
AtGSTU19
AtGSTU20
AtGSTU22
AtGSTU28
AtGSTU21
AtGSTU25
AtGSTU24
ZmGSTU1
AtGSTU23
AtGSTU26
AtGSTU27
0.1

**Figure S1**

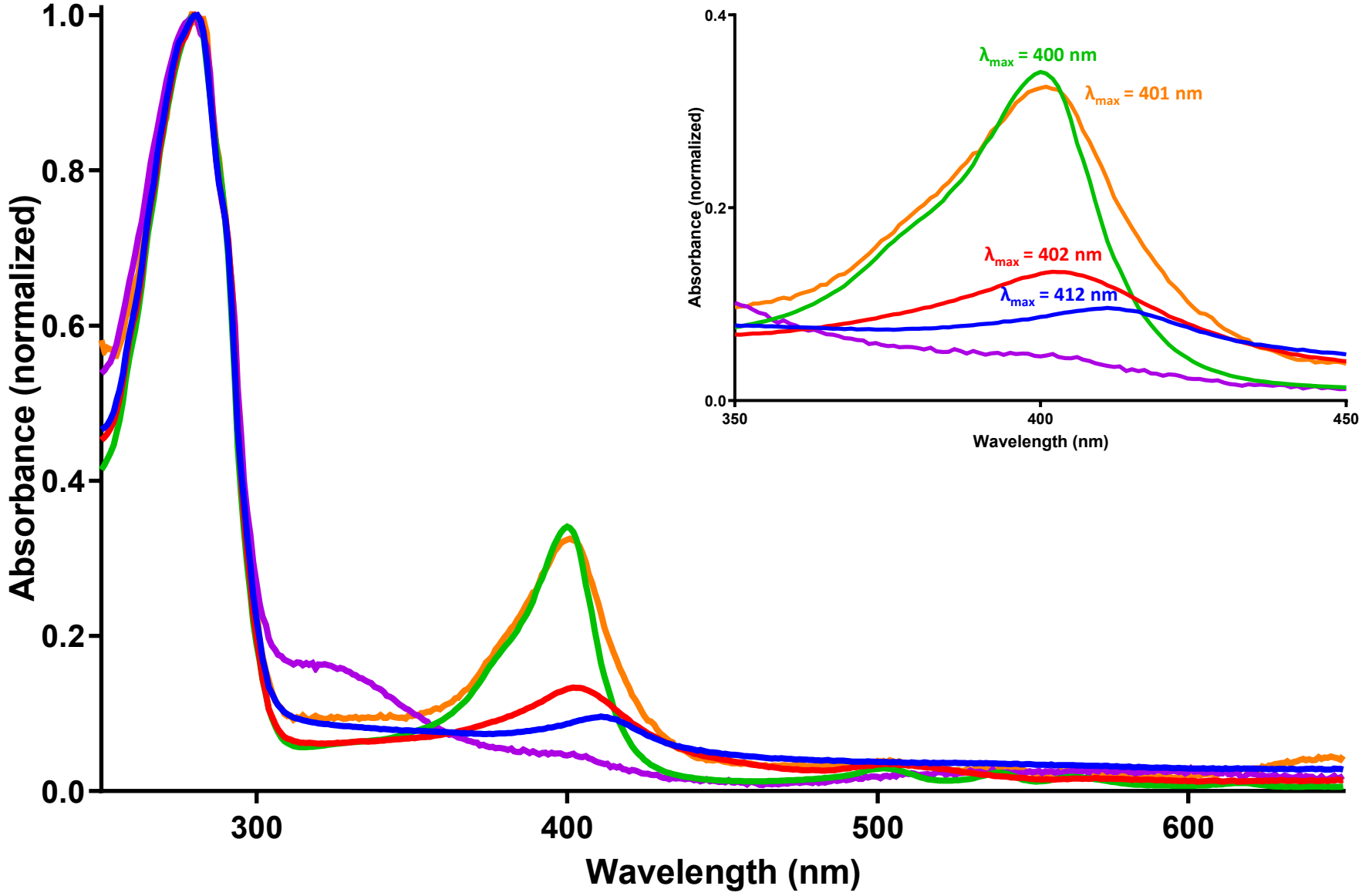
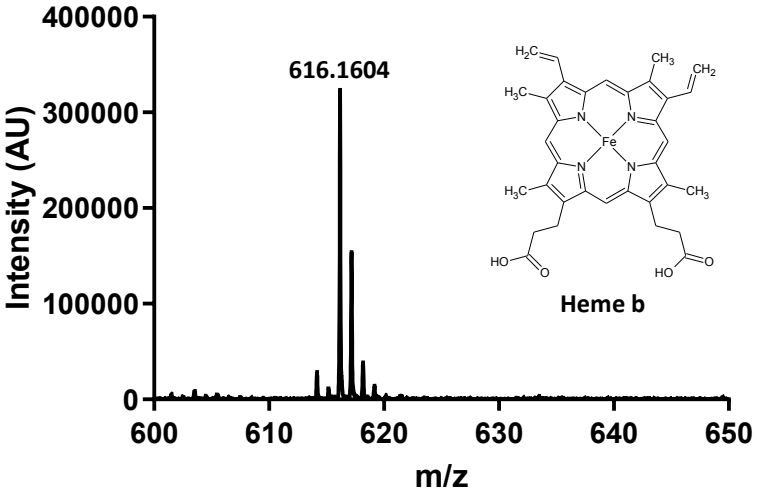

Absorbance (normalized)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
300
400
500
600
Wavelength (nm)
λmax = 400 nm
λmax = 401 nm
λmax = 402 nm
λmax = 412 nm
Absorbance (normalized)
0.4
0.2
0.0
350
400
450
Wavelength (nm)

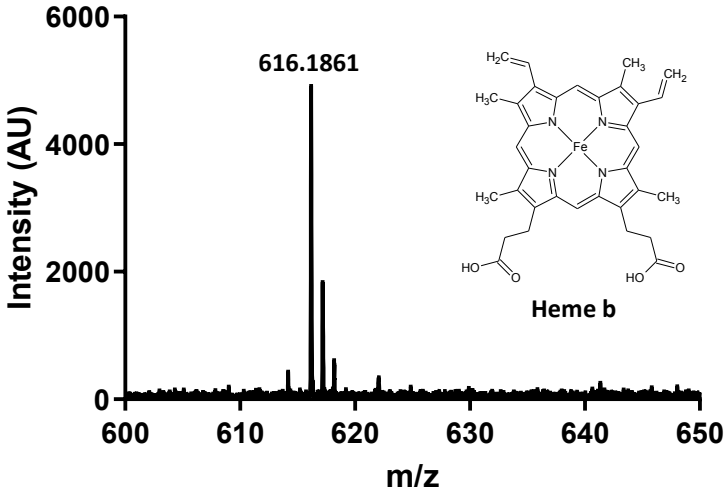


Figure S2

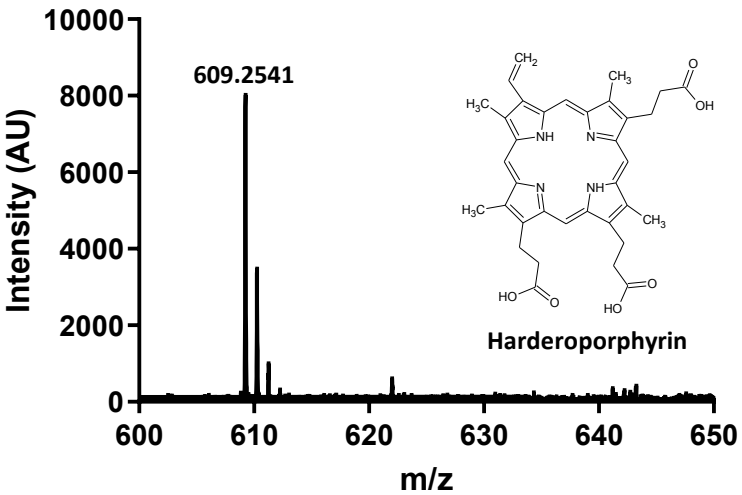
**AtGSTU8**




**AtGSTU16**




**AtGSTU19**




**ZmGSTU1**

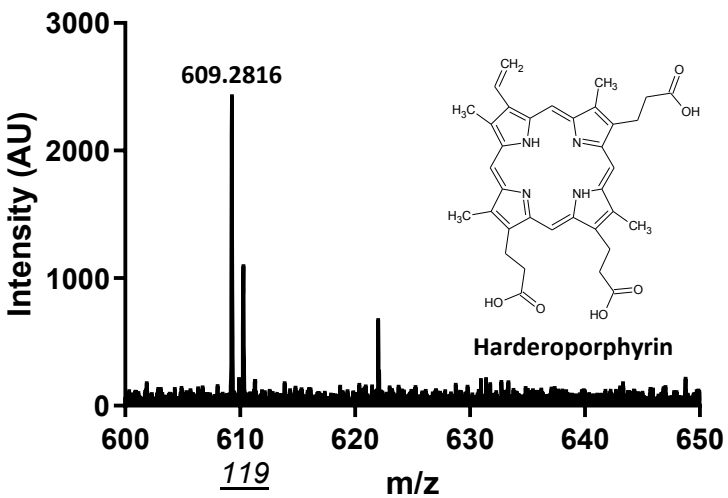
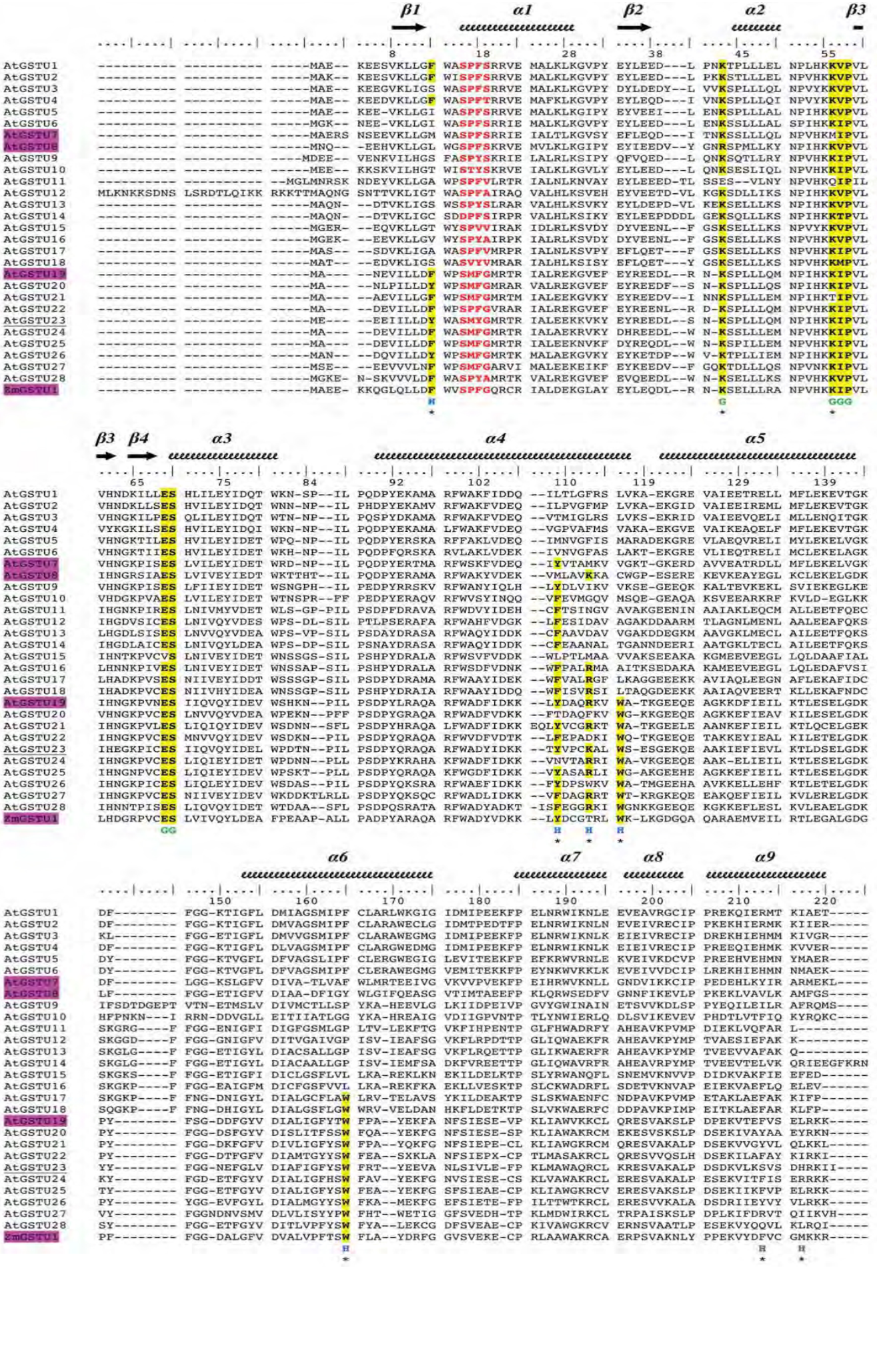





**Figure S3**


β1 α1 β2 α2 β3
AtGSTU1 AtGSTU2 AtGSTU3 AtGSTU4 AtGSTU5 AtGSTU6 AtGSTU7 AtGSTU8 AtGSTU9 AtGSTU10 AtGSTU11 AtGSTU12 AtGSTU13 AtGSTU14 AtGSTU15 AtGSTU16 AtGSTU17 AtGSTU18 AtGSTU19 AtGSTU20 AtGSTU21 AtGSTU22 AtGSTU23 AtGSTU24 AtGSTU25 AtGSTU26 AtGSTU27 AtGSTU28 ZmGSTU1
β3 β4 α3 α4 α5
AtGSTU1 AtGSTU2 AtGSTU3 AtGSTU4 AtGSTU5 AtGSTU6 AtGSTU7 AtGSTU8 AtGSTU9 AtGSTU10 AtGSTU11 AtGSTU12 AtGSTU13 AtGSTU14 AtGSTU15 AtGSTU16 AtGSTU17 AtGSTU18 AtGSTU19 AtGSTU20 AtGSTU21 AtGSTU22 AtGSTU23 AtGSTU24 AtGSTU25 AtGSTU26 AtGSTU27 AtGSTU28 ZmGSTU1
α6 α7 α8 α9
AtGSTU1 AtGSTU2 AtGSTU3 AtGSTU4 AtGSTU5 AtGSTU6 AtGSTU7 AtGSTU8 AtGSTU9 AtGSTU10 AtGSTU11 AtGSTU12 AtGSTU13 AtGSTU14 AtGSTU15 AtGSTU16 AtGSTU17 AtGSTU18 AtGSTU19 AtGSTU20 AtGSTU21 AtGSTU22 AtGSTU23 AtGSTU24 AtGSTU25 AtGSTU26 AtGSTU27 AtGSTU28 ZmGSTU1

## C. Analyse de l'activité catalytique des GSTUs

Les propriétés enzymatiques des 9 AtGSTUs et 6 PtGSTUs ont été analysées. La présence d'une sérine conservée au sein de leur site actif suggérait que ces protéines catalysent plutôt des réactions de conjugaison du glutathion et de réduction de peroxydes comme la plupart des GSTs à sérine conservée. L'activité de conjugaison du GSH a été mesurée à l'aide de différents substrats modèles (CDNB, dérivés d'isothiocyanates, PNP-butyrate et 4-HNE) par spectrophotométrie en suivant la formation des conjugués glutathionylés respectifs (GS-DNB (1-(S-glutathionyl)-2,4-dinitrobenzène), dérivés dithiocarbamate glutathionylés, …). Les résultats obtenus montrent qu'une courbe de saturation hyperbolique typique d'une cinétique de type Michaelis-Menten pour chaque isoforme d'AtGSTU et chaque substrat testé. A partir de ces courbes de saturation, il a été possible de déterminer les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique ($K_M$ apparent et $k_{cat}$) et de calculer l'efficacité catalytique ($k_{cat}/K_M$) de chaque enzyme pour chacun des substrats testés (tableau 3). Les paramètres cinétiques ont été obtenus en se plaçant dans des conditions saturantes en GSH (le $K_M$ du GSH est généralement compris entre 10 et 100 µM pour les GSTs à sérine catalytique). De façon générale, l'affinité apparente des protéines AtGSTUs pour le CDNB est de l'ordre du millimolaire alors qu'elle est de l'ordre de la dizaine de micromolaire pour le phénétyl-isothiocyanate (PITC). L'efficacité catalytique est un paramètre cinétique qui nous permet de comparer les activités enzymatiques entre elles car il prend aussi bien en considération l'affinité de l'enzyme pour le substrat que le nombre de cycles effectués par l'enzyme par unité de temps (constante catalytique de l'enzyme). Plus la valeur $k_{cat}/K_M$ est grande, plus l'efficacité catalytique est importante. Nous avons ainsi déterminé que les AtGSTUs du premier clade (AtGSTU1, 6, 7) ont une meilleure efficacité catalytique avec le PITC qu'avec le CDNB (de l'ordre de 10 à 1100 fois plus efficaces) alors que la situation est inversée pour les enzymes du troisième clade (AtGSTU19, 22, 24 et 25). Elles sont ici de 2 à 500 fois plus efficaces avec le CDNB que le PITC. Dans le cas des AtGSTU8 et 16, aucune différence significative d'efficacité catalytique n'a été observée avec ces substrats même si cette dernière semble légèrement plus forte pour le PITC (ces enzymes sont 3 fois plus efficaces avec le PITC que le CDNB). Concernant l'activité de conjugaison de GSH des GSTUs de peuplier, les protéines PtGSTU19, 20, 27, 30, 46 et 52 possèdent globalement une activité de conjugaison de GSH sur le CDNB. Par contre, aucune activité n'a été détectée envers le HNE avec les PtGSTU30, 46 et 52 et envers le PNP-butyrate avec les PtGSTU46 et 52. L'affinité apparente des GSTUs de peuplier pour ces différents substrats varie de l'ordre de la dizaine de micromolaire pour les isothiocyanates et le HNE à la centaine de micromolaire voire du micromolaire pour le PNP-butyrate et le CDNB. En ce qui concerne les efficacités catalytiques de ces enzymes, la protéine PtGSTU30 (clade I) possède une meilleure efficacité catalytique (de l'ordre de 25 à 210 fois plus élevée qu'avec les autres substrats) avec le CDNB alors que la PtGSTU27 (clade II) est plus efficace avec le HNE (de 8 à 800 fois plus efficace en comparaison avec les autres substrats). Les représentants des clades III et IV, PtGSTU19 et 20, PtGSTU46 et 52 respectivement, ont une meilleure efficacité catalytique avec les isothiocyanates.

L'activité peroxydase a été testée contre l'hydroperoxyde de cumène, l'hydroperoxyde de tert-butyle et le peroxyde d'hydrogène. Elle a été mesurée indirectement par mesure spectrophotométrique de l'oxydation de NADPH en $NADP^+$ à 340 nm à l'aide d'un système couplé impliquant la glutathion réductase. Les molécules de GSSG issues de la réaction entre les peroxydes et les GSTUs sont réduites en GSH par la glutathion réductase. Ainsi, chaque mole de GSH consommée provoque l'oxydation d'une mole de NADPH en $NADP^+$. Les paramètres cinétiques des enzymes envers l'hydroperoxyde de cumène figurent dans le tableau 3. Exceptée la protéine AtGSTU7, toutes les GSTUs d'Arabidopsis étudiées ont la capacité de réduire l'hydroperoxyde de cumène et possèdent ainsi une activité peroxydase. Contrairement aux résultats obtenus pour l'activité de conjugaison du glutathion, aucune tendance générale n'est observée avec ce substrat. Les valeurs d'efficacité catalytique varient entre 70 et 6000 $M^{-1}.s^{-1}$. L'absence d'activité thiol-transférase contre le HED a été constatée pour les

PtGSTUs. En effet ce type d'activité est caractéristique des GSTs ayant une cystéine au sein de leur site actif.

**Tableau 3 :** Tableau récapitulatif des paramètres cinétiques obtenus pour les activités de conjugaison de glutathion, thiol-transférase et peroxydase des GSTUs. (N.D : non détectable et / : aucune mesure réalisée)

| | CDNB | PITC | BITC | PNP-butyrate | HNE | HED | CuOOH | t-BOOH/$H_2O_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **$k_{cat}$ ($s^{-1}$)** | | | | | | | | |
| *Arabidopsis thaliana* | | | | | | | | |
| **AtGSTU1** | 0,50 ± 0,10 | 3,70 ± 0,14 | / | / | / | / | 0,42 ± 0,04 | N.D |
| **AtGSTU6** | 2,20 ± 0,10 | 26,40 ± 0,60 | / | / | / | / | 1,50 ± 0,10 | N.D |
| **AtGSTU7** | 3,50 ± 0,60 | 0,32 ± 0,01 | / | / | / | / | N.D | N.D |
| **AtGSTU8** | 2,60 ± 0,30 | 0,14 ± 0,04 | / | / | / | / | 1,10 ± 0,05 | N.D |
| **AtGSTU16** | 3,40 ± 0,30 | 0,09 ± 0,00 | / | / | / | / | 0,50 ± 0,03 | N.D |
| **AtGSTU19** | 23,00 ± 1,00 | 0,08 ± 0,00 | / | / | / | / | 0,19 ± 0,06 | N.D |
| **AtGSTU22** | 506,00 ± 48,00 | 0,21 ± 0,00 | / | / | / | / | 0,10 ± 0,00 | N.D |
| **AtGSTU24** | 27,00 ± 1,00 | 0,94 ± 0,03 | / | / | / | / | 0,83 ± 0,05 | N.D |
| **AtGSTU25** | 51,00 ± 1,00 | 0,68 ± 0,01 | / | / | / | / | 2,94 ± 0,15 | N.D |
| *Populus trichocarpa* | | | | | | | | |
| **PtGSTU19** | 28,80 ± 2,20 | 3,80 ± 0,10 | 7,00 ± 0,10 | 0,04 ± 0,00 | 0,11 ± 0,01 | N.D | 0,17 ± 0,01 | N.D |
| **PtGSTU20** | 0,59 ± 0,03 | 5,10 ± 0,10 | 10,40 ± 0,30 | 0,02 ± 0,00 | 0,11 ± 0,00 | N.D | 0,24 ± 0,01 | N.D |
| **PtGSTU27** | 8,91 ± 0,37 | 0,06 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 1,35 ± 0,05 | N.D | 0,78 ± 0,02 | N.D |
| **PtGSTU30** | 143,00 ± 2,00 | 0,70 ± 0,01 | 1,50 ± 0,02 | 1,30 ± 0,02 | N.D | N.D | 0,22 ± 0,01 | N.D |
| **PtGSTU46** | 0,08 ± 0,00 | 0,30 ± 0,02 | 0,98 ± 0,00 | N.D* | N.D | N.D | 1,2 ± 0,03 | N.D |
| **PtGSTU52** | 1,20 ± 0,02 | 1,35 ± 0,07 | 1,86 ± 0,05 | N.D | N.D | N.D | N.D | N.D |
| **$K_M$ (µM)** | | | | | | | | |
| *Arabidopsis thaliana* | | | | | | | | |
| **AtGSTU1** | 2210,00 ± 660,00 | 35,00 ± 4,50 | / | / | / | / | 1432,00 ± 283,00 | N.D |
| **AtGSTU6** | 1250,00 ± 190,00 | 11,90 ± 1,10 | / | / | / | / | 358,00 ± 90,00 | N.D |
| **AtGSTU7** | 8740,00 ± 2350,00 | 78,00 ± 10,00 | / | / | / | / | N.D | N.D |
| **AtGSTU8** | 1550,00 ± 400,00 | 31,30 ± 3,50 | / | / | / | / | 275,00 ± 50,00 | N.D |
| **AtGSTU16** | 1755,00 ± 496,00 | 13,70 ± 1,60 | / | / | / | / | 903,00 ± 145,00 | N.D |
| **AtGSTU19** | 240,00 ± 50,00 | 31,80 ± 3,50 | / | / | / | / | 2775,00 ± 1495,00 | N.D |
| **AtGSTU22** | 5220,00 ± 1030,00 | 9,40 ± 0,90 | / | / | / | / | 287,00 ± 45,00 | N.D |
| **AtGSTU24** | 800,00 ± 140,00 | 60,60 ± 7,30 | / | / | / | / | 809,00 ± 122,00 | N.D |
| **AtGSTU25** | 3,06 ± 0,46 | 22,00 ± 2,00 | / | / | / | / | 510,00 ± 78,00 | N.D |

| | CDNB | PITC | BITC | PNP-butyrate | HNE | HED | CuOOH | t-BOOH/$H_2O_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Populus trichocarpa* | | | | | | | | |
| **PtGSTU19** | 3394,00 ± 502,00 | 48,40 ± 2,50 | 52,70 ± 3,60 | 443,50 ± 31,10 | 56,40 ± 7,40 | N.D | 196,50 ± 31,10 | N.D |
| **PtGSTU20** | 1777,00 ± 193,00 | 56,80 ± 4,10 | 149,60 ± 17,60 | 329,20 ± 28,10 | 30,60 ± 3,50 | N.D | 98,60 ± 15,40 | N.D |
| **PtGSTU27** | 3299,00 ± 261,00 | 148,10 ± 11,40 | 23,60 ± 1,70 | 566,50 ± 47,00 | 46,56 ± 4,60 | N.D | 346,50 ± 32,40 | N.D |
| **PtGSTU30** | 112,00 ± 6,00 | 51,80 ± 5,10 | 28,40 ± 1,40 | 226,80 ± 18,40 | N.D | N.D | 629,80 ± 82,60 | N.D |
| **PtGSTU46** | 214,00 ± 18,00 | 127,20 ± 28,30 | 67,20 ± 5,10 | N.D* | N.D | N.D | 132,70 ± 15,20 | N.D |
| **PtGSTU52** | 482,00 ± 36,00 | 303,50 ± 40,00 | 167,10 ± 14,40 | N.D | N.D | N.D | N.D | N.D |
| **$k_{cat}/K_M$ ($10^3 M^{-1}.s^{-1}$)** | | | | | | | | |
| *Arabidopsis thaliana* | | | | | | | | |
| **AtGSTU1** | 0,22 ± 0,03 | 105,50 ± 4,50 | / | / | / | / | 0,29 ± 0,03 | N.D |
| **AtGSTU6** | 1,78 ± 0,09 | 2205,00 ± 53,05 | / | / | / | / | 4,20 ± 0,29 | N.D |
| **AtGSTU7** | 0,40 ± 0,06 | 4,14 ± 0,14 | / | / | / | / | N.D | N.D |
| **AtGSTU8** | 1,71 ± 0,21 | 4,63 ± 0,13 | / | / | / | / | 4,01 ± 0,19 | N.D |
| **AtGSTU16** | 1,96 ± 0,02 | 6,64 ± 0,17 | / | / | / | / | 0,55 ± 0,14 | N.D |
| **AtGSTU19** | 95,48 ± 4,33 | 2,57 ± 0,10 | / | / | / | / | 0,07 ± 0,02 | N.D |
| **AtGSTU22** | 96,95 ± 9,27 | 21,83 ± 0,43 | / | / | / | / | 0,34 ± 0,02 | N.D |
| **AtGSTU24** | 33,29 ± 1,65 | 15,50 ± 0,52 | / | / | / | / | 1,02 ± 0,06 | N.D |
| **AtGSTU25** | 16550,00 ± 400,00 | 31,09 ± 0,65 | / | / | / | / | 5,76 ± 0,29 | N.D |
| *Populus trichocarpa* | | | | | | | | |
| **PtGSTU19** | 8,90 ± 0,80 | 79,00 ± 1,10 | 132,20 ± 0,20 | 0,10 ± 0,00 | 2,00 ± 0,10 | N.D | 0,80 ± 0,04 | N.D |
| **PtGSTU20** | 0,33 ± 0,01 | 88,90 ± 1,80 | 69,80 ± 2,20 | 0,05 ± 0,00 | 3,60 ± 0,10 | N.D | 2,40 ± 0,10 | N.D |
| **PtGSTU27** | 2,70 ± 0,01 | 0,43 ± 0,01 | 3,80 ± 0,05 | 0,04 ± 0,00 | 31,00 ± 1,20 | N.D | 2,40 ± 0,06 | N.D |
| **PtGSTU30** | 1280,00 ± 13,70 | 12,70 ± 0,30 | 51,30 ± 0,60 | 5,60 ± 0,10 | N.D | N.D | 0,40 ± 0,02 | N.D |
| **PtGSTU46** | 0,38 ± 0,01 | 2,10 ± 0,15 | 14,63 ± 0,33 | N.D* | N.D | N.D | 9,30 ± 0,20 | N.D |
| **PtGSTU52** | 2,50 ± 0,04 | 4,46 ± 0,24 | 11,13 ± 0,29 | N.D | N.D | N.D | N.D | N.D |

# Chapitre II : La caractérisation structurale des GSTUs

Comme indiqué précédemment, la caractérisation structurale des GSTUs d'*Arabidopsis thaliana* et de *Populus trichocarpa* a été réalisée en collaboration avec l'équipe BioMod du laboratoire CRM2 dirigée par Claude Didierjean. Dans le cadre de cette collaboration, j'ai été notamment en charge du clonage des séquences codant les protéines d'intérêt, de la production et de la purification des protéines correspondantes. Toutes les étapes qui ont conduit à l'obtention des structures tridimensionnelles (de la cristallogenèse à la résolution des structures) ont été réalisées par l'équipe BioMod. La recherche des conditions de cristallisation est le point de départ à cette caractérisation structurale. Ainsi nos collaborateurs ont testé différentes méthodes pour générer les cristaux. L'ensemble des tests réalisés est répertorié dans le tableau 4.
Bien que plus de 5680 essais aient été réalisés sur les 5 AtGSTUs sélectionnées, seule la protéine AtGSTU7 a été cristallisée avec succès et sa structure tridimensionnelle résolue. Concernant les PtGSTUs, plus de 7960 essais ont été réalisés et 6 structures sont en cours d'affinement. Des essais de cristallogenèse ont également été entrepris sur la GSTU1 de maïs sans que ceux-ci n'aient aboutis.

La caractérisation structurale des PtGSTUs sera présentée sous la forme d'un article que nous soumettrons prochainement (article 3). Une récente étude réalisée sur des gènes orthologues de GSTUs provenant de trois espèces de peuplier (*Populus euphratica*, *Populus trichocarpa* et *Populus yatungensis*) a révélé que ces orthologues possèdent des divergences fonctionnelles (Yang et al. 2019). Afin de vérifier si des gènes paralogues (issus d'un évènement de duplication d'un gène ancestral au sein d'un génome d'une même espèce par opposition aux gènes orthologues) possèdent des divergences fonctionnelles, nous avons réalisé la caractérisation biochimique et structurale des produits de deux gènes paralogues de *Populus trichocarpa, PtGSTU19* et *PtGSTU20*.
Après avoir produit et purifié les protéines PtGSTU19 et 20, j'ai entamé leurs caractérisations biochimiques puis structurales (collaboration avec l'équipe BioMod). Nous avons tout d'abord confirmé que ces dernières adoptent une organisation dimérique et qu'elles présentent des activités enzymatiques (activité de conjugaison par le GSH et réduction des peroxydes) classiquement retrouvées chez les GSTs à sérine conservée. Les activités mesurées pour les deux protéines purifiées sont globalement comparables sur les substrats testés à l'exception du CDNB pour lequel la PtGSTU19 présente une efficacité catalytique 30 fois plus élevée. La résolution des structures tridimensionnelles des deux protéines a révélé un changement d'orientation de l'hélice α6 de la protéine PtGSTU20 engendré par la rotation du groupe phénol de la tyrosine 160. La mutation de ce résidu dans chacune des protéines n'a pas eu d'impact notable sur les activités catalytiques portées par ces deux protéines. Enfin notre étude s'est achevée par la recherche de ligands par la méthode de dénaturation thermique par fluorescence. Parmi les molécules interagissant avec ces protéines, j'ai identifié la baïcaléine qui est une molécule de la famille des flavonoïdes.

### Article 3 : Biochemical and structural insights in two poplar Tau glutathione transferase paralogs GSTU19 and 20

Elodie Sylvestre-Gonon, Sandrine Mathiot, Alexis Boutilliat, Nicolas Rouhier, Claude Didierjean et Arnaud Hecker

**Tableau4 :** Tableau récapitulatif des expériences de cristallogènese réalisées.
Le numéro du lot de protéines, les techniques de cristallisation utilisées ainsi que le nombre d'essai réalisés pour générer les cristaux sont présentés. Diffusion : technique de la diffusion de vapeur, cross-seed : méthodes de l'ensemencement, PPIX : protoporphyrine IX

| Protéine | Etiquette $(His)_6$ | Stabilité | Essais de cristallogenèse | Conditions de cristallisation | Diffraction | Résolution (Å) | Affinement |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ***Arabidopsis thaliana*** | | | | |
| **AtGSTU1** | Oui | Instable | / | / | / | / | / |
| **AtGSTU6** | Oui | Stable +/- | Lot 18/05/17, microbatch, 434 essais<br>Lot 20/05/18, microbatch, 18 essais<br>Lot 20/05/18, diffusion, microbatch, 288 essais | 1 condition | / | / | / |
| **AtGSTU7** | Oui | Instable | Lot 27/11/19, diffusion, 384 essais | 4 conditions | Oui | 1,85 | En cours |
| **AtGSTU8** | Oui | Instable | Lot 08/03/17, microbatch, 434 essais<br>Lot 07/12/17, diffusion, cross-seed, 1248 essais<br>Lot 07/12/17, optimisation diffusion, 48 essais<br>Lot 29/03/18, optimisation diffusion, 30 essais<br>Lot 18/04/18, optimisation diffusion, 27 essais | 2 conditions | / | / | / |
| **AtGSTU8** | Non | Stable | Lot 14/01/20, diffusion, 960 essais | / | / | / | / |
| **AtGSTU16** | Oui | Stable +/- | Lot 27/11/19, diffusion, 384 essais | / | / | / | / |
| **AtGSTU19** | Oui | Stable +/- | Lot 05/12/2017, microbatch, 624 essais<br>Lot 26/11/2019, diffusion, 768 essais<br>Lot 26/11/19, microbatch, 34 essais | 1 condition | / | / | / |
| **AtGSTU22** | Oui | Instable | / | / | / | / | / |
| **AtGSTU24** | Oui | Instable | / | / | / | / | / |
| **AtGSTU25** | Oui | Stable +/- | / | / | / | / | / |
| | | | ***Populus trichocarpa*** | | | | |
| **PtGSTU19** | Non | Stable | Lot 12/02/19, diffusion, 1248 essais<br>Lot 12/02/19, microbatch, 45 essais<br>Lot 12/02/19, optimisation microbatch, 24 essais | 3 conditions | Oui | 1,6 | En cours |
| **PtGSTU19-GSH** | Non | Stable | Lot 12/02/19, microbatch, 40 essais | 2 conditions | Oui | ???? | En cours |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **PtGSTU19-PPIX** | | | Lot 19/06/2019, microbatch, 20 essais | 2 conditions | | | |
| **PtGSTU19-Baïcaléine** | Non | Stable | Diffusion baicaléine (7h) dans boite du 20190219<br>Lot 12/02/19, microbatch, 40 essais | 2 conditions | Oui<br>(3 collectes à SOLEIL) | 1,8 ; 2,0 ; 1,9 et 1,95 | En cours/ Pas de densité observée pour le ligand |
| **PtGSTU20** | Non | Stable | Lot 06/05/19, microbatch,diffusion, 576 essais<br>Lot 06/05/19, microbatch, 40 essais | 4 conditions | Oui | 2 | En cours |
| **PtGSTU20-GSH** | Non | Stable | Lot 06/05/19, microbatch, 40 essais | 2 conditions | Oui | 1,6 | En cours |
| **PtGSTU20-Baïcaléine** | Non | Stable | Lot 06/05/19, microbatch, 20 essais | 2 conditions | Oui | 2 | En cours |
| **PtGSTU27** | Non | Stable | Lot 17/04/19, microbatch, diffusion, 1872 essais<br>Lot 17/04/19, microbatch, 15 essais<br>Lot 17/04/19, microbatch, 15 essais | 2 conditions | Oui | 2,5 | Problème de macle, Pas d'affinement |
| **PtGSTU30** | Non | Stable | Lot 13/11/18, microbatch, 96 essais<br>Lot 13/11/18, microbatch, 48 essais<br>Lot 22/01/19, microbatch, diffusion, 1872 essais<br>Lot 22/01/19, microbatch, 30 essais<br>Lot 22/01/19 microbatch, 5 essais<br>Lot 12/02/19, microbatch, 20 essais | 6 conditions | Oui | 2,5 | Affinement non terminé (structure déjà publiée) |
| **PtGSTU46** | Non | Stable | / | / | / | / | / |
| **PtGSTU52** | Non | Stable | Lot 23/05/19, microbatch, diffusion, 1872 essais<br>Lot 23/05/19, microbatch, 15 essais | 3 conditions | / | / | / |
| | | | ***Zea mays*** | | | | |
| **ZmGSTU1** | Oui | Stable | Lot 11/10/18, microbatch 48 essais<br>Lot 11/10/18, microbatch 48 essais<br>Lot 22/11/18, diffusion, 1248 essais | / | / | / | / |
| **ZmGTU1-PPIX** | Oui | Stable | Lot 30/10/19, diffusion, 768 essais | / | / | / | / |

# Article 3

## Biochemical and structural insights on two poplar Tau glutathione transferase paralogs GSTU19 and 20

**Elodie Sylvestre-Gonon[1], Sandrine Mathiot[2], Alexis Boutilliat[1], Nicolas Rouhier[1], Claude Didierjean[2] and Arnaud Hecker[1,*]**

[1] Université de Lorraine, INRAE, IAM, 54000 Nancy, France.
[2] Université de Lorraine, CNRS, CRM2, F-54000, Nancy, France.
* To whom correspondence should be addressed: arnaud.hecker@univ-lorraine.fr

**Abstract**
Glutathione transferases (GST) constitute a widespread superfamily of enzymes notably involved in xenobiotic detoxification or secondary metabolism. Soluble GSTs are structurally characterized by a thioredoxin N-terminal domain and a α-helical C-terminal domain. *Populus trichocarpa* possesses more than 80 isoforms, split into cysteinyl- (Cys-GSTs) or serinyl-GSTs (Ser-GSTs) depending on the conserved residue present in the catalytic signature. While Ser-GSTs exhibit GSH-conjugating activity, Cys-GSTs perform the opposite reaction leading to deglutathionylation of small glutathionylated molecules. Among the 54 GSTs from the Tau class (GSTU) identified in *Populus trichocarpa*, we have performed the biochemical and structural characterization of PtGSTU19 and PtGSTU20, two paralogs sharing more than 95 % of sequence similarity. These enzymes display the distinctive GSH-conjugation and peroxidase activities of Ser-GSTs against model substrates (CDNB, isocyanate derivatives, peroxides). The resolution of the 3D structures of these proteins revealed that despite their high primary sequence conservation, they display significant structural variations upon GSH addition leading to the folding of helix α2 in PtGSTU20 and to conformational changes in helix α6 in PtGSTU19. In a screen of potential ligands, we were able to identify an interaction with baicalein, whose binding inhibited GSH-conjugation activity. In the structure of a PtGSTU20-baicalein complex, baicalein was positioned in the H-site but extended to the G-site. The results allow delineating better the ligandin activity of these poplar GSTU paralogs, suggesting their implication in flavonoid transport.

**Keywords:** baicalein, flavonoid, glutathione transferase, *Populus trichocarpa*, structure

**Introduction**
Glutathione transferases (GST) constitute a widespread superfamily of versatile enzymes able to modify a broad range of molecules by catalyzing diverse enzymatic reactions. These include glutathione (GSH) conjugation, peroxidase, thiol-transferase, deglutathionylation or dehydroascorbate reductase activities [1–4]. Beside their catalytic properties, these enzymes are able to transport molecules through their non-catalytic ligandin properties. They are involved in the protection of cells from a wide range of biotic and abiotic stresses such as UV radiation or pathogen attacks by participating either to the detoxification of toxic compounds (often referred to as xenobiotics) or to the synthesis of secondary, defense metabolites. At the structural level, GSTs consist of a conserved N-terminal domain adopting a thioredoxin (TRX) fold and containing most of the residues participating to the binding of GSH (G site) linked to a more variable C-terminal domain (helix bundle) containing the residues involved in the binding of hydrophobic molecules (H site). Both sites (G and H sites) constitute the active site of the enzyme. Depending on the conserved residue (usually serine or cysteine in plant isoforms) present in their catalytic site, GSTs have opposite activities. While serinyl-

GSTs catalyze GSH-conjugation reaction, cysteinyl-GSTs rather catalyze the deglutathionylation of small molecules. In terrestrial plants, GSTs are divided into at least 14 classes namely lambda (L), hemerythrin (H), iota (I), ure2p, glutathionyl-hydroquinone reductase (GHR), elongation factor 1B gamma (EF1Bγ), dehydroascorbate reductase (DHAR), metaxin (MTX), microsomal prostaglandin E synthase type-2 (mPGES-2), phi (F), tau (U), tetrachlorohydroquinone dehalogenase (TCHQD), theta (T) and zeta (Z) classes [5]. In the model tree *Populus trichocarpa* (poplar), more than 80 GST isoforms were identified and categorized into 11 classes, in the absence of Ure2p, iota and hemerythrin representatives. While there are only 2 to 3 members in each GST class in plants, the Tau and Phi classes are highly represented and corresponding genes often organized in clusters. In *Populus trichocarpa*, there are 54 GSTU and 8 GSTF isoforms. This expansion compared to other classes is the result of several duplication events that occurred during evolution [6–13]. We recently proposed in [14] that these gene duplication/clusterisation events could either create functional redundancy between GST isoforms or on contrary generate structural and functional diversity after mutation accumulation on certain genes. The idea of functional redundancy between orthologs is often considered for functional annotation of new released genome but whether this assumption is true often remains to be validated. A recent study conducted on the three poplar species *Populus euphratica*, *Populus trichocarpa* and *Populus yatungensis* led to the identification of 21 GST orthologous groups [15]. Although the sequences of these orthologous groups are well preserved, non-synonymous substitutions at key amino acid sites play an important role in the divergence of enzyme functions. In order to obtain validation that the homolog/paralog redundancy rule applies to members of the poplar GST family, we focus in this study on the two *Populus trichocarpa* paralogous proteins PtGSTU19 and PtGSTU20. After production in *E. coli* and purification of both recombinant proteins, the biochemical and structural properties have been compared. Despite the high conservation of their primary sequences and enzymatic signatures, we observed that PtGSTU19 and PtGSTU20 paralogues display substantial structural differences. Looking for ligands/substrates of both enzymes, we were able to identify baicalein, a flavonoid, as a potential ligand. These interactions were confirmed by inhibition tests and by crystallography as we were able to solve the structure of the PtGSTU20-baicalein complex.

**Materials and methods**

**Cloning, site-directed mutagenesis, protein expression and purification.**

The sequences coding for PtGSTU19 (Potri.008G174900) and PtGSTU20 (Potri.008G175000) were amplified by PCR from poplar cDNA using specific primers (Table S1) and cloned into pET12a plasmid between *Nde*I and *Bam*HI restriction sites. Site directed mutagenesis was performed using mutagenic oligonucleotides (Table S1) and the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies).

Wild type and mutated proteins were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) expression strain (Novagen) containing the pSBET plasmid (expressing the agg and aga recognizing tRNA) upon transformation with the recombinant pET12a plasmids. Bacteria were grown at 37°C in LB medium supplemented with kanamycin (50 $\mu g.ml^{-1}$) and ampicillin (50 $\mu g.ml^{-1}$) until the cell culture reached an $OD_{600nm}$ of 0.7-0.8. Recombinant protein expression was then induced with 0.1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and cells were further grown for 4h. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl lysis buffer and stored at -20°C. Cell lysis was completed by sonication and the cell extract further centrifuged at 35,000 g for 25 min at 4°C to remove cellular debris and aggregated proteins. C-terminal His-tagged proteins were purified by gravity-flow chromatography on a nickel nitrilotriacetate (Ni-NTA) agarose resin according to the manufacturer's recommendation followed by an exclusion chromatography on a Superdex200 column connected to an ÄKTA-Purifier™ (GE Healthcare). Purified proteins were stored in 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl buffer at -20°C. Protein concentrations were determined after

measuring the absorbance at 280 nm using a theoretical molar absorption coefficient of 46410 $M^{-1}.cm^{-1}$ for PtGSTU19, 43430 $M^{-1}.cm^{-1}$ for PtGSTU20 and 44920 $M^{-1}.cm^{-1}$ for PtGSTU19Y160A, PtGSTU19Y160C, PtGSTU19Y160F and PtGSTU20C160Y variants. The molecular masses of the purified proteins were checked by mass spectrometry.

**Measurement of enzymatic activities.**

The GSH-conjugation activities were assayed toward phenetyl-isothiocyanate (PITC), benzyl-isothiocyanate (BITC), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), 4-nitrophenyl-butyrate (PNP-butyrate) at 25°C in a final volume of 500 µl as described previously [9]. Various concentrations of PITC (5–500 µM), HNE (6.25–175 µM), CDNB (125–5000 µM), BITC (7.5–900 µM) or PNP-butyrate (50–2500 µM) have been tested at a fixed GSH concentration of 1 mM. When using HNE as a substrate, the GSH concentration was fixed at 0.7 mM to limit interferences with HNE at 224 nm. Thiol-transferase and peroxidase activities have been measured toward 2-hydroxyethyl disulfide (HED), and cumene hydroperoxide (CuOOH), tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) or hydrogen peroxide ($H_2O_2$) respectively using an NADPH-coupled spectrophotometric assay. The reactions were carried out in 500 µL of Tris-HCl 30 mM pH 8.0, EDTA 1 mM containing 150 µM NADPH, 0.5 units of yeast glutathione reductase and various concentrations of CuOOH (12.5–2000 µM) and a fixed concentration of 1 mM of GSH.

Inhibition tests of the GSH-conjugation activity were assayed at 25°C in 500 µL of 100 mM pH 6.4 phosphate buffer containing various concentrations of BITC (7.5-700 µM), a fixed concentration of GSH (1 mM) and 3 different concentrations of baicalein (0, 1.5, 3 or 15 µM). These experiments were carried out at 25°C by following the reaction at 274 nm.

The measured velocities were corrected by subtracting the rate of spontaneous non-enzymatic reaction and three independent experiments were performed at each substrate concentration. The kinetic parameters ($k_{cat}$ and apparent $K_m$) were obtained by fitting the data to the non-linear regression Michaelis–Menten model (kinetic assays) or to the mixed inhibition model (inhibition assays) in GraphPad Prism 6 software. The $k_{cat}$ values are expressed as µmol of substrate oxidized per second per µmol of enzyme (*i.e.*, the turnover number in $s^{-1}$), using specific molar absorption coefficients of 9600 $M^{-1}.cm^{-1}$ at 340 nm for CDNB, 9250 $M^{-1}.cm^{-1}$ at 274 nm for BITC, 8890 $M^{-1}.cm^{-1}$ at 274 nm for PITC, 17700 $M^{-1}.cm^{-1}$ at 412 nm for PNP-butyrate, 13750 $M^{-1}.cm^{-1}$ at 224 nm for HNE and 6220 $M^{-1}.cm^{-1}$ at 340 nm for NADPH.

**Identification of potential PtGSTU19 and PtGSTU20 ligands by thermal shift assays.**

The experiments were performed in 96 well microplates (Harshell, Biorad) and the measurements carried out using a real time PCR detection system (CFX 96 touch, Biorad). Assays were performed in a mixture (final volume of 25 µl) containing 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 µM of organic compounds (diluted in 8% DMSO) originating from a chemical library of almost 50 compounds (Table S2), 10 µM of PtGSTU19 (or 20 µM of PtGSTU20), 5X SYPRO orange (previously diluted 80−fold in ultra-pure water). Fluorescence was measured each minute at 530 nm after excitation at 485 nm starting after 3 minute incubation at 5°C and increasing the temperature from 5 to 95°C with a step of 1°C per minute. The denaturation temperature, which corresponds to the temperature for which 50% of the total fluorescence is measured, was determined by using the non-linear regression Boltzmann sigmoidal model in GraphPad Prism 6 software for data obtained in presence of potential ligands. This temperature was compared with a reference assay in which organic compounds replaced by the equivalent DMSO concentration.

**Crystallization and structure determination of recombinant PtGSTU19 and 20.**

The pre-crystallization test (PCT from Hampton Ltd) was used to determine the most promising range of protein concentrations for the initial screenings (10-20 mg/ml for PtGSTU19 and 20-40 mg/ml for PtGSTU20). Preliminary crystallization conditions were found with Oryx 8 robot (Douglas Instruments Ltd) of the CRM2 crystallogenesis platform (University of Lorraine). The screens were performed in 96-well plates using the sitting-drop vapour-diffusion method with purchased crystallization kits (Wizard™ Classic kits 1-4 from Rigaku Ltd, Structure Screens 1-2 from Molecular Dimension Ltd, Classic kits 1-10 and JCSG kit from JENA Bioscience Ltd, 624 conditions). Both protein solutions contained 30 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA. Crystallization plates were stored at 4°C. Three and four conditions yielded crystals for PtGSTU19 (Sts 1-15, Sts 1-20 and JSB 2-C4) and PtGSTU20 (JBS 2-B6, JBS 2-C4, JBS 2-D5 and PCT B2), respectively. The crystals were optimized manually using the microbatch under oil method with the conditions Sts 1-15 and Sts 1-20 for PtGSTU19 and with the condition JBS 2-B6 for PtGSTU20. Suitable crystals for X-ray diffraction were obtained by varying the protein/condition volume ratio (1 µL/2 µL, 1.5 µL/1.5 µL and 2 µL/1 µL). Sts 1-15 condition contains 0.2 M magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M sodium cacodylate pH 6.5 and 20 % w/v PEG 8000. Sts 1-20 condition contains 0.2 M calcium acetate hydrate, 0.1 M sodium cacodylate pH 6.5 and 18 % w/v PEG 8000. JBS 2-B6 condition contains 200 mM calcium chloride, 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 20 % w/v PEG 4000. Crystals of PtGSTU19/20-GSH and PtGSTU20-baicalein were obtained by co-crystallization using a concentration ligand of 5 mM. All crystals were flash frozen in a liquid nitrogen stream at 100 K after a quick soaking in their mother liquor supplemented with 20% glycerol.

Preliminary X-ray diffraction experiments were carried out in-house on an Agilent SuperNova diffractometer (Oxford Diffraction) equipped with a CCD detector and data further collected at SOLEIL synchrotron on beamlines PROXIMA-1 and -2 (Saclay, France). Data sets were indexed and integrated with XDS [16], scaled and merged with Aimless [17] from the CCP4 suite [18]. The structure of PtGSTU19 was solved by molecular replacement using MOLREP [19] with the coordinates of GSTU from *Ricinus communis* (PDB code 4J2F) as the search model. The structure of PtGSTU20 was solved by molecular replacement using MOLREP with the coordinates of PtGSTU19 as the search model. For PtGSTU19/20-GSH and PtGSTU20-baicalein complexes, electron density maps revealed unambiguously the presence of the GSH or baicalein in the active site of the protein. Structures were then refined with PHENIX [20] and manually adjusted with COOT [21]. Validation of all structures was performed with MolProbity [22] and the wwPDB validation server (http://validate.wwpdb.org). Crystal data, diffraction and refinement statistics are shown in table 2 and all structural figures were generated with PyMol. Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (PDB codes PtGSTU19: XXXX ; PtGSTU19-GSH: XXXX, PtGSTU20: XXXX ; PtGSTU20-GSH: XXXX and PtGSTU20-baicalein: XXXX).

**Results and discussion**

**Phylogenetic diversity of GSTUs from *Populus trichocarpa***

In a previous study [6], Lan et al. identified 81 putative genes coding for full-length GSTs in the version 1.1 of *P. trichocarpa* genome. The tau and phi GSTs were the most represented with 58 and 9 members respectively. Among these genes, 66 were located on 15 of the 19 chromosomes, while the other 15 were assigned to 14 scaffold fragments. The distribution of *GST* genes between chromosomes was uneven since chromosomes 7, 9, 17, and 18 harbor no GST gene unlike chromosomes 1, 8, 10, 11, 14, and 19 where GSTs were arranged in clusters. Among GSTU encoding genes, 37 were arranged in six clusters (clusters I to V and VII) on chromosomes 1, 8, 10, 11 and 19 whereas 4 *GSTF* genes were in one cluster (cluster VI) on chromosome 14. Members of the minor GST classes were sparsely distributed at single loci on different chromosomes. A reexamination of *P. trichocarpa* genome using the last version of annotation (V3 assembly, Phytozome) prompted us to identify 54 genes coding for full-length

GSTUs. 52 genes are distributed on the 19 chromosomes and 2 are still found on unattributed scaffold fragments (scaffolds 503 and 1865) (Figure S1). Among these genes, 41 genes are organized into 5 different clusters distributed over 5 chromosomes (chromosomes 1, 8, 10, 11, 12). A phylogenetic analysis performed using poplar GSTU amino acid sequences led us to identify 4 different clades (Figure S2). Isoforms from clade I exhibit a conserved SPFG active site motif, whereas isoforms of clade II, III and IV present respectively a SPFA/V, SPFX, SP/LFS/C catalytic signature. Among the isoforms grouped in clade I, one (Potri.011G140600) exhibits an atypical signature in which the conserved serine, that normally contributes to the lowering of the pKa of the thiol group of the GSH, is substituted by an alanine. The absence of this conserved serine may be compensated by the presence of 2 serinyl residues in positions 3 and 4 of the catalytic motif APSS. Such a situation was already described for some poplar GSTFs [23]. In terms of sequence identity, all these isoforms share between 24 to 100% (46 to 100%) of sequence identity (sequence similarity). Within a clade, the percentage of sequence identity ranges from 35 to 100% whereas between clades, it ranges from 24 to 65%. None of the GSTU sequences identified in poplar possesses a recognizable targeting sequence suggesting that all these proteins are likely cytosolic as already suggested for other GSTU proteins [24]. Among identified genes, Potri.008G174900 and Potri.008G175000, which respectively code for PtGSTU19 and PtGSTU20, are two adjacent genes likely arising from a duplication event of an ancestral gene (Figure S1 and S2). Theses isoforms share more than 91 % of sequence identity and more than 95 % of sequence similarity.

**Both PtGSTU19 and 20 present a typical enzymatic signature of Ser-GSTs**

To get insight about the biochemical and structural properties on both PtGSTU19 and PtGSTU20, we produced the corresponding recombinant proteins using a bacterial heterologous system (*E. coli*) and purified them employing a two-step purification strategy. Around 50 mg of soluble protein per liter of culture were obtained for both proteins (Figure S3). Molecular masses of 24892 and 24796 Da were obtained respectively for the purified PtGSTU19 and PtGSTU20 recombinant proteins. They are compatible with the theoretical molecular masses after removal of the start methionine (131 Da) (Figure S3). Furthermore, SEC/MALS analysis revealed that they adopt an homogenous dimeric quaternary arrangement as expected for typical GSTUs (Figure S3) [23,25]. Retention tests on GSH-Sepharose affinity chromatography, where PtGSTU19 was partially retained on the resin unlike PtGSTU20, indicated that the GSH-binding site (G site) of the purified proteins is already partially or totally occupied by a molecule (very likely GSH) (Figure S3).

As PtGSTU19 and 20 possess a conserved serine in their active site, we then explored their enzymatic activities by using typical substrates of Ser-GSTs. Thus, GSH-conjugation activity was measured toward CDNB, isothiocyanate derivatives (PITC and BITC), PNP-butyrate and HNE (Table 1). PtGSTU19 and 20 were catalytically active on almost all substrates (except for hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide), with a lowest catalytic efficiency ($k_{cat}/K_M$) around 100 $M^{-1}.s^{-1}$ for PNP-butyrate (Table 1). The PtGSTU19 and PtGSTU20 recorded catalytic efficiencies and turnover numbers for CDNB are on the same order of magnitude as those obtained for GSTU2 and for GSTU9 from *Larix kaempferi* [26]. Other catalytic efficiency values of PtGSTU19 ranged from 2.0 x $10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$ for HNE to 132.2 x $10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$ for BITC and those of PtGSTU20 from 0.3 x $10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$ for CDNB to 88.9 x $10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$ for PITC. Both enzymes exhibited better catalytic efficiencies (around 1.0 x $10^5$ $M^{-1}.s^{-1}$) with isothiocyanate derivatives essentially due to better affinities ($K_{M,app}$ around 50 µM) and catalytic turnovers (5 $s^{-1}$) compared to other substrates (Table 1). Such observation has been documented with the poplar GSTU16 (*Populus trichocarpa*) [27] and with *Arabidopsis thaliana* GSTU4, 6, 10, 12 and 13 [24]. The sole substantial catalytic difference observed between PtGSTU19 and PtGSTU20 was toward CDNB for which the catalytic efficiency of PtGSTU19 was 30 times higher than the one of PtGSTU20. Peroxidase activity was also examined toward several model peroxide substrates such as CuOOH, t-BOOH and $H_2O_2$ as Ser-GSTs often reduce peroxides [25,28,29]. No peroxidase activity was detected toward t-BOOH and $H_2O_2$ even using a high concentration of enzyme up to 10 µM. However, peroxidase activity was detected

using CuOOH as substrate. A catalytic efficiency of 800 $M^{-1}.s^{-1}$ and 2400 $M^{-1}.s^{-1}$ was measured for PtGSTU19 and PtGSTU20 respectively.
Regardless the organism from which GSTUs are derived, the kinetic parameters measured for these enzymes are similar (from $10^2$ to $10^7$ $M^{-1}.s^{-1}$ for GSH conjugation activity and $10^2$ to $10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$ for peroxidase activity) [30–36]. When these values are compared with those of plant, insect, fungal and mammalian Ser-GSTs [37–40,25,4], they are close, placing the GSTUs at the same rank as all other Ser-GSTs.

**Both PtGSTU19 and PtGSTU20 interact with baicalein *in vitro***

To further characterize PtGSTU19 and U20 at the biochemical level, we sought to identify their potential ligands or substrates. Interaction of PtGSTU19 and U20 with a set of chemical molecules that include different classes of specialized metabolites (coumarins, flavonoids, terpenes) found in plants, have been screened using thermal shift assay (TSA) (Table S2). The thermal denaturation of the proteins is followed by monitoring the fluorescence enhancement of a probe (SYPRO Orange) that binds to protein hydrophobic patches upon denaturation process. This rapid and simple technique, which can be used to screen buffer conditions, ligands, cofactors and drugs, has been successfully used to detect interactions between fungal GSTs and libraries of molecules [41,42]. Among the chemical compounds tested, baicalein was the only one which significantly increased the stability of PtGSTU19 ($\Delta T_m$> 1.49°C), other molecules having no significant impact or decreasing the stability of both recombinant proteins. To further validate such interaction, we investigated the capacity of baicalein to inhibit the GSH-conjugation activity of PtGSTU19 and U20. Recombinant enzymes (100 nM) were incubated with GSH (1 mM) and increasing concentration of BITC at fixed baicalein concentrations (1.5, 3 and 15 µM). After fitting the results to a non-linear regression curve, we were able to measure an inhibitory constant ($K_i$) of 2 µM and 0.2 µM for PtGSTU19 and PtGSTU20 respectively indicating that baicalein inhibited the GSH-conjugating activity of both proteins. As the inhibition is competitive, baicalein should bind in the active site or at its vicinity. However, we did not detect GSH-conjugated baicalein suggesting the interaction is non-catalytic.

**Structural analysis of both PtGSTU19 and PtGSTU20 reveals structural discrepancies**

The crystal structures of PtGSTU19 and U20 were solved in their apo form ($PtGSTU19^{APO}$ and $PtGSTU20^{APO}$) and in complex with GSH ($PtGSTU19^{GSH}$ and $PtGSTU20^{GSH}$). We attempted to co-crystallize them with the flavone baicalein. Although we obtained yellow crystals in both cases, the electron density maps showed a residual peak only in the active site of PtGSTU20. A baicalein molecule was successfully placed in the residual peak and the crystal structure of the complex PtGSTU20 with baicalein was referred to as $PtGSTU20^{BAI}$. All the crystals of PtGSTU19 and U20 are isomorphic. The space group is $P4_12_12$ and the asymmetric unit contains one monomer. The dimer axis coincides with the crystallographic dyads.
Since PtGSTU19 and 20 have very close sequences, their overall three-dimensional structures are very close as well (RMSD of 0.36 Å between $U19^{GSH}$ and $U20^{GSH}$ monomers). However, there are significant differences and PtGSTU19 and 20 structures have distinct properties (see below). The dimers adopt the usual open V-shaped structure of Tau and Omega GSTs (Figure 2) [14]. The buried area at the interface is around 2300 $Å^2$ and the polar interactions at the interface involve $Glu_{75}$ with $Arg_{90}$ and $Arg_{94}$ in both structures. PtGSTU19 and 20 have the same secondary structures as the known GSTU structures and show the canonical cytosolic GST fold [14]. It contains an N-terminal TRX domain ($\beta1\alpha1\beta2\alpha2\beta3\beta4\alpha3$) followed by a bundle of six $\alpha$-helices ($\alpha4\alpha5\alpha6\alpha7\alpha8\alpha9$) (Figure 2). In $PtGSTU19^{GSH}$ and $PtGSTU20^{GSH}$ complexes, a glutathione molecule is bound to the G-site, whose residues are mainly carried by the N-terminal domain. The five residues involved in polar interactions with GSH ($Ser_{12}$, $Lys_{39}$, $Ile_{53}$, $Glu_{65}$ and $Ser_{66}$) are invariant in the known GSTU structures (Figure 3). The GSH was found partially oxidized to sulfenic acid GSOH in $PtGSTU19^{GSH}$ complex (Figure 2). The GSOH was likely formed during

crystallization after oxidation of the thiol group of GSH as documented for the GSTU10 from *Glycine max* [43]. Indeed, a mass spectrometry analysis of the GSH sample used for co-crystallization confirmed the absence of GSOH traces. GSOH is naturally formed as an intermediate by the reaction of GSH with hydroperoxides. The reaction of GSH with hydroperoxides is achieved in two steps. It involves the nucleophilic attack by the thiolate group of GSH on hydroperoxide resulting in the formation of GSOH. Then, the sulfenic acid reacts non-enzymatically with a second GSH molecule to produce glutathione disulfide (GSSG) [44].

Comparisons of structures with and without GSH revealed distinct conformational transitions in PtGSTU19 and PtGSTU20. In PtGSTU20$^{APO}$, no signal was found in the electronic density maps corresponding to helix α2 and its upstream and downstream loops (residues $Glu_{34}$ to $Lys_{51}$). In contrast, this region is well defined in the final electron density map of PtGSTU20$^{GSH}$ complex and adopts the same conformation as observed in known GSTU structures including PtGSTU19$^{APO}$ and PtGSTU19$^{GSH}$ (Figure 3). This region contains invariant $Lys_{39}$ that stabilizes the C-terminal carboxylate group of glutathione. PtGSTU19 and PtGSTU20 differ by a single amino acid between residues 34 and 51 ($Ala_{37}$ and $Thr_{37}$ in PtGSTU19 and 20, respectively). This region has the same crystalline environment in both structures because the crystals of PtGSTU19 and 20 are isomorphic. The difference between PtGSTU19 and 20 could be explained by some additional intramolecular interactions in PtGSTU19. The lateral chain of $Glu_{33}$ in PtGSTU19 ($Val_{33}$ in PtGSTU20) form two hydrogen bonds that are obviously absent in PtGSTU20. The side chain of $Leu_{37}$ in PtGSTU19 ($Leu_{37}$ in PtGSTU20) is in van der Waals contact with $Phe_9$, which is a serine residue in PtGSTU20. In any case, this region is one of the regions with the highest B factors in PtGSTU19$^{APO}$ form.

Nearly two thirds of the helix α6 of PtGSTU19$^{APO}$ form (residues $Val_{159}$ to $Gly_{170}$) was refined in two conformations (Figure 4). This part of helix α6 has a conserved tryptophan residue ($Trp_{161}$) in GSTUs that is assumed to be one of the walls of the H site (Figure 3) [14]. The first conformation corresponds to the one usually found in GSTU structures including PtGSTU20$^{APO}$ and PtGSTU20$^{GSH}$. $Trp_{161}$ is partially solvent-exposed (Accessible Surface Area (ASA) of 42 Å$^2$) in this first conformation. In the second conformation, $Trp_{161}$ is more buried (ASA of 11 Å$^2$) and the side chain of $Tyr_{160}$ points in direction of the assumed catalytic serine residue ($Ser_{12}$). In PtGSTU19$^{GSH}$ complex, only the second conformation is still present. There is no strong polar interaction between the GSH molecule and $Tyr_{160}$ since the distance between $Tyr_{160}$ OH atom and GSH SG atom is of 6 Å. However, the side chain of $Tyr_{160}$ should have an electrostatic influence on glutathione molecule, which should favor its oxidation. A cysteine residue replaces $Tyr_{160}$ in PtGSTU20 ($Cys_{160}$) and only the first conformation is present whatever the form (PtGSTU20$^{APO}$ and PtGSTU20$^{GSH}$). Substitution of PtGSTU19 $Tyr_{160}$ by an alanine, cysteine or phenylalanine (PtGSTU19Y160A, PtGSTU19Y160C and PtGSTU19Y160F variants respectively) and PtGSTU20 $Cys_{160}$ by a tyrosine (PtGSTU20 C160Y) did affect (or very few) neither affinity for the electrophilic substrate nor turnover number of both enzymes (Table S3). All recorded catalytic efficiencies and turnover numbers for these protein variants are within the same magnitude range as those determined for wild-type enzymes. Only one significant difference was observed, which was difficult to rationalize. In PtGSTU19Y160F variant, the apparent affinity for glutathione was reduced by a factor of 4 with PITC as electrophilic substrate while no variation was detected with BITC.

In PtGSTU20$^{BAI}$ complex, a baicalein molecule is located at the interface between N-terminal and C-terminal domains covering the electrophilic-substrate binding site (H-site) and in part the G-site (Figure 4). This means that PtGSTU20 could not accommodate a glutathione molecule and a baicalein molecule at the same time. The baicalein phenyl-ring sits in an aliphatic pocket well delineated by residues from helices α4 ($Thr_{104}$, $Phe_{107}$ and $Phe_{111}$), α6 ($Leu_{157}$, $Phe_{158}$, $Trp_{161}$, $Leu_{162}$ and $Ile_{165}$) and α9 ($Met_{209}$) (Figures 2 and 3). Although most of these aliphatic residues are conserved in PtGSTU19, the double conformation of helix α6 reduces the volume of the aliphatic pocket, which is too small to hold a phenyl ring. The baicalein molecule do not form strong polar interaction with PtGSTU20. The smallest polar contact is of 3.5 Å between the side chain of $His_{208}$ and an alcohol-group of baicalein.

Structural alignment performed with either Dali [45] or mTM-align [46] using the ten structures of GSTUs available in the RCSB Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/, [47]), including one from poplar (PtGSTU30, PDB IDs 5J4U and 5J5N) [15], suggests GSTU from *Ricinus communis* (RcGSTU, PDB ID 4J2F) as the closest structural homolog of PtGSTU19 and 20. The similarity trees based on pairwise TM- or Dali-scores separate the GSTUs into two clades, one of which includes RcGSTU, PtGSTU19 and 20 isoforms (Figure 4). mTM-align generates an interesting sequence alignment highlighting the common regions *i.e.* regions with no gap and with pairwise residue distances less than 4 (Figure 3). Almost the entire N-terminal domain is a common region, while the C-terminal domain is interspersed with many variable regions located mainly in the loops between the helices. If these remarks have already been made in the numerous studies on GSTs, our alignment also points to variable regions in the heart of helices α4, α6 and α7. It is often difficult to explain why several isoforms are grouped because this is the result of an overall effect at the level of primary and three-dimensional structures. In the case of RcGSTU, PtGSTU19 and 20, it seems relatively clear. The specific residues of this subclass are concentrated in the helices α7 and α8 (Figure 3). However, this region has no known role in either substrate binding or dimerization but could interact with protein partners through protein-protein interactions.

Of the crystallographic studies of GSTUs, only two report structures both in apo form and in complex with glutathione. The first one is a *Mangifera indica* GSTU in which GSH binding induces structural changes in three loops. The main change is located in the loop between helices α5 and α6, which is not part of the G- and H-sites [36]. The second study concerns GSTU23 from *A. thaliana* in which only slight local conformational changes were noted upon GSH binding [48]. In PtGSTU19 and 20, significant structural variations were observed, which surprisingly induce distinct secondary structure modifications: folding of helix α2 and conformational changes in helix α6 for PtGSTU20 and PtGSTU19 respectively. Structural investigations between apo- and GSH-bound-forms in other GST classes (Alpha, Pi, Delta, Epsilon and yeast GTT) revealed also different behaviors across classes [49]. When a significant structural change is observed, helix α2 most often undergoes the most prominent rearrangement, as in the case of PtGSTU20. The other regions involved surrounds H-site as the C-terminus of α4 as well as most of the loop to helix α5 and the C-terminus of helix α8 [49]. In PtGSTU19, it is helix α6, which is also part of the H-site. To our knowledge, this is the first time that this helix is observed involved in the binding process of GSH. Helix α6 located in the heart of the GST subunit was found to be stable due to the presence of the N-capping motif [50–52]. The latter contains a quasi-invariant aspartate residue in GSTs ($Asp_{152}$ in PtGSTU19) whose side chain stabilizes the N-terminal side of helix α6. Our study as well as others show that two even closely related GSTs/enzymes may appear to have significantly different local dynamic properties while having close kinetic constants.

**Conclusions**

In conclusion, we demonstrated in this study that poplar GSTU19 and GSTU20 are enzymatically similar and possess the typical GSH-conjugation and peroxidase activities hold by Ser-GSTs. However, despite their high conservation in term of primary sequences, we noticed structural specificities between these paralogues. Both enzymes interact with baicalein which is a flavonoid that has many medicinal benefits and is notably found in roots of *Scutellariae* species and in many plant species [53–55]. Although baicalein was not detected in poplar species so far, these results suggest that these poplar GSTUs could be involved in flavonoid metabolism similar to the BZ2 or GST1 proteins, two GSTUs from *Zea mays* or *Vitis vinifera* respectively, that bind anthocyanins [56,57].

While orthologous genes could be functionally different [15], we provide in this study experimental evidence that these paralogous genes have similar function. Thus apparent functional redundancy of PtGSTU19 and PtGSTU20 paralogues could highlight their importance in the cell.

**Acknowledgments**

This work was supported by a grant from ANR as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01 and ANR-17-CE20-0008-01). We acknowledge SOLEIL for providing synchrotron radiation facilities, and we thank the staff of PROXIMA-1 beamline for assistance.

**References**

1. Garcerá A, Barreto L, Piedrafita L, Tamarit J, Herrero E. *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. Biochemical Journal. 2006;398: 187–196. doi:10.1042/BJ20060034

2. Federici L, Masulli M, Gianni S, Di Ilio C, Allocati N. A conserved hydrogen-bond network stabilizes the structure of Beta class glutathione S-transferases. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2009;382: 525–529. doi:10.1016/j.bbrc.2009.03.052

3. Lallement P-A, Roret T, Tsan P, Gualberto JM, Girardet J-M, Didierjean C, et al. Insights into ascorbate regeneration in plants: investigating the redox and structural properties of dehydroascorbate reductases from *Populus trichocarpa*. Biochemical Journal. 2016;473: 717–731. doi:10.1042/BJ20151147

4. Gonzalez D, Fraichard S, Grassein P, Delarue P, Senet P, Nicolaï A, et al. Characterization of a Drosophila glutathione transferase involved in isothiocyanate detoxification. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2018;95: 33–43. doi:10.1016/j.ibmb.2018.03.004

5. Lallement P-A, Brouwer B, Keech O, Hecker A, Rouhier N. The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. Frontiers in Pharmacology. 2014;5. doi:10.3389/fphar.2014.00192

6. Lan T, Yang Z-L, Yang X, Liu Y-J, Wang X-R, Zeng Q-Y. Extensive Functional Diversification of the Populus Glutathione S-Transferase Supergene Family. The Plant Cell. 2009;21: 3749–3766. doi:10.1105/tpc.109.070219

7. Jain M, Ghanashyam C, Bhattacharjee A. Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses. BMC Genomics. 2010;11: 73. doi:10.1186/1471-2164-11-73

8. Dong Y, Li C, Zhang Y, He Q, Daud MK, Chen J, et al. Glutathione S-Transferase Gene Family in Gossypium raimondii and G. arboreum: Comparative Genomic Study and their Expression under Salt Stress. Front Plant Sci. 2016;7. doi:10.3389/fpls.2016.00139

9. He G, Guan C-N, Chen Q-X, Gou X-J, Liu W, Zeng Q-Y, et al. Genome-Wide Analysis of the Glutathione S-Transferase Gene Family in Capsella rubella: Identification, Expression, and Biochemical Functions. Frontiers in Plant Science. 2016;7. doi:10.3389/fpls.2016.01325

10. Xu L, Chen W, Si G-Y, Huang Y-Y, Lin Y, Cai Y-P, et al. Genome-wide analysis of the GST gene family in Gossypium hirsutum L. Yi Chuan. 2017;39: 737–752. doi:10.16288/j.yczz.16-435

11. Han X-M, Yang Z-L, Liu Y-J, Yang H-L, Zeng Q-Y. Genome-wide profiling of expression and biochemical functions of the Medicago glutathione S-transferase gene family. Plant Physiology and Biochemistry. 2018;126: 126–133. doi:10.1016/j.plaphy.2018.03.004

12. Islam MDS, Choudhury M, Majlish A-NK, Islam T, Ghosh A. Comprehensive genome-wide analysis of Glutathione S-transferase gene family in potato ( Solanum tuberosum L.) and their expression

profiling in various anatomical tissues and perturbation conditions. Gene. 2018;639: 149–162. doi:10.1016/j.gene.2017.10.007

13. Khan N, Hu C, Amjad Khan W, Hou X. Genome-Wide Identification, Classification, and Expression Divergence of Glutathione-Transferase Family in *Brassica rapa* under Multiple Hormone Treatments. BioMed Research International. 2018;2018: 1–19. doi:10.1155/2018/6023457

14. Sylvestre-Gonon E, Law SR, Schwartz M, Robe K, Keech O, Didierjean C, et al. Functional, Structural and Biochemical Features of Plant Serinyl-Glutathione Transferases. Front Plant Sci. 2019;10: 608. doi:10.3389/fpls.2019.00608

15. Yang Q, Han X, Gu J, Liu Y, Yang M, Zeng Q. Functional and structural profiles of GST gene family from three *Populus* species reveal the sequence–function decoupling of orthologous genes. New Phytol. 2019;221: 1060–1073. doi:10.1111/nph.15430

16. Kabsch W. *XDS*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010;66: 125–132. doi:10.1107/S0907444909047337

17. Evans PR, Murshudov GN. How good are my data and what is the resolution? Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2013;69: 1204–1214. doi:10.1107/S0907444913000061

18. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al. Overview of the *CCP* 4 suite and current developments. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2011;67: 235–242. doi:10.1107/S0907444910045749

19. Vagin A, Teplyakov A. Molecular replacement with *MOLREP*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010;66: 22–25. doi:10.1107/S0907444909042589

20. Liebschner D, Afonine PV, Baker ML, Bunkóczi G, Chen VB, Croll TI, et al. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in *Phenix*. Acta Crystallogr D Struct Biol. 2019;75: 861–877. doi:10.1107/S2059798319011471

21. Emsley P, Cowtan K. *Coot* : model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2004;60: 2126–2132. doi:10.1107/S0907444904019158

22. Davis IW, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. Nucleic Acids Research. 2004;32: W615–W619. doi:10.1093/nar/gkh398

23. Pégeot H, Koh CS, Petre B, Mathiot S, Duplessis S, Hecker A, et al. The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1. Frontiers in Plant Science. 2014;5. doi:10.3389/fpls.2014.00712

24. Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ, Edwards R. Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. Journal of Experimental Botany. 2009;60: 1207–1218. doi:10.1093/jxb/ern365

25. Pégeot H, Mathiot S, Perrot T, Gense F, Hecker A, Didierjean C, et al. Structural plasticity among glutathione transferase Phi members: natural combination of catalytic residues confers dual biochemical activities. The FEBS Journal. 2017;284: 2442–2463. doi:10.1111/febs.14138

26. Yang Q, Liu Y-J, Zeng Q-Y. Biochemical functions of the glutathione transferase supergene family of Larix kaempferi. Plant Physiology and Biochemistry. 2014;77: 99–107. doi:10.1016/j.plaphy.2014.02.003

27. Musdal Y, Mannervik B. Substrate specificities of two tau class glutathione transferases inducible by 2,4,6-trinitrotoluene in poplar. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2015;1850: 1877–1883. doi:10.1016/j.bbagen.2015.05.015

28. Kilili KG, Atanassova N, Vardanyan A, Clatot N, Al-Sabarna K, Kanellopoulos PN, et al. Differential Roles of Tau Class Glutathione *S* -Transferases in Oxidative Stress. J Biol Chem. 2004;279: 24540–24551. doi:10.1074/jbc.M309882200

29. Axarli I, Dhavala P, Papageorgiou AC, Labrou NE. Crystallographic and Functional Characterization of the Fluorodifen-inducible Glutathione Transferase from Glycine max Reveals an Active Site Topography Suited for Diphenylether Herbicides and a Novel L-site. Journal of Molecular Biology. 2009;385: 984–1002. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.084

30. Cummins I, O'Hagan D, Jablonkai I, Cole DJ, Hehn A, Werck-Reichhart D, et al. Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat. Plant Mol Biol. 2003;52: 591–603.

31. Axarli I, Dhavala P, Papageorgiou AC, Labrou NE. Crystal structure of *Glycine max* glutathione transferase in complex with glutathione: investigation of the mechanism operating by the Tau class glutathione transferases. Biochemical Journal. 2009;422: 247–256. doi:10.1042/BJ20090224

32. Lo Piero AR, Mercurio V, Puglisi I, Petrone G. Different roles of functional residues in the hydrophobic binding site of two sweet orange tau glutathione S-transferases: Functional role of the GST H-site residues. FEBS Journal. 2010;277: 255–262. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07481.x

33. Chronopoulou E, Madesis P, Asimakopoulou B, Platis D, Tsaftaris A, Labrou NE. Catalytic and structural diversity of the fluazifop-inducible glutathione transferases from Phaseolus vulgaris. Planta. 2012;235: 1253–1269. doi:10.1007/s00425-011-1572-z

34. Liu Y-J, Han X-M, Ren L-L, Yang H-L, Zeng Q-Y. 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. 2013;161: 773–786. doi:10.1104/pp.112.205815

35. Chronopoulou E, Madesis P, Tsaftaris A, Labrou NE. Cloning and Characterization of a Biotic-Stress-Inducible Glutathione Transferase from Phaseolus vulgaris. Appl Biochem Biotechnol. 2014;172: 595–609. doi:10.1007/s12010-013-0509-3

36. Valenzuela-Chavira I, Contreras-Vergara CA, Arvizu-Flores AA, Serrano-Posada H, Lopez-Zavala AA, García-Orozco KD, et al. Insights into ligand binding to a glutathione S-transferase from mango: Structure, thermodynamics and kinetics. Biochimie. 2017;135: 35–45. doi:10.1016/j.biochi.2017.01.005

37. Sawicki R, Singh SP, Mondal AK, Beneš H, Zimniak P. Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from Drosophila melanogaster, and identification of additional nine members of the Epsilon class. Biochemical Journal. 2003;370: 661–669. doi:10.1042/bj20021287

38. Wang B, Peng Y, Zhang T, Ding J. Crystal structures and kinetic studies of human Kappa class glutathione transferase provide insights into the catalytic mechanism. Biochemical Journal. 2011;439: 215–225. doi:10.1042/BJ20110753

39. Mathieu Y, Prosper P, Favier F, Harvengt L, Didierjean C, Jacquot J-P, et al. Diversification of Fungal Specific Class A Glutathione Transferases in Saprotrophic Fungi. Treseder K, editor. PLoS ONE. 2013;8: e80298. doi:10.1371/journal.pone.0080298

40. Hu C, Wang W, Ju D, Chen G, Tan X, Mota-Sanchez D, et al. Functional characterization of a novel λ-cyhalothrin metabolizing glutathione *S* -transferase, CpGSTe3, from the codling moth *Cydia pomonella*. Pest Manag Sci. 2020;76: 1039–1047. doi:10.1002/ps.5614

41. Perrot T, Schwartz M, Saiag F, Salzet G, Dumarçay S, Favier F, et al. Fungal Glutathione Transferases as Tools to Explore the Chemical Diversity of Amazonian Wood Extractives. ACS Sustainable Chem Eng. 2018;6: 13078–13085. doi:10.1021/acssuschemeng.8b02636

42. Schwartz M, Perrot T, Aubert E, Dumarçay S, Favier F, Gérardin P, et al. Molecular recognition of wood polyphenols by phase II detoxification enzymes of the white rot Trametes versicolor. Scientific Reports. 2018;8. doi:10.1038/s41598-018-26601-3

43. Skopelitou K, Muleta AW, Papageorgiou AC, Chronopoulou E, Labrou NE. Catalytic features and crystal structure of a tau class glutathione transferase from Glycine max specifically upregulated in response to soybean mosaic virus infections. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2015;1854: 166–177. doi:10.1016/j.bbapap.2014.11.008

44. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2013;1830: 3217–3266. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018

45. Holm L, Laakso LM. Dali server update. Nucleic Acids Res. 2016;44: W351–W355. doi:10.1093/nar/gkw357

46. Dong R, Pan S, Peng Z, Zhang Y, Yang J. mTM-align: a server for fast protein structure database search and multiple protein structure alignment. Nucleic Acids Research. 2018 [cited 13 Aug 2020]. doi:10.1093/nar/gky430

47. Burley SK, Berman HM, Bhikadiya C, Bi C, Chen L, Di Costanzo L, et al. RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. Nucleic Acids Research. 2019;47: D464–D474. doi:10.1093/nar/gky1004

48. Tossounian M-A, Van Molle I, Wahni K, Jacques S, Gevaert K, Van Breusegem F, et al. Disulfide bond formation protects Arabidopsis thaliana glutathione transferase tau 23 from oxidative damage. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2018;1862: 775–789. doi:10.1016/j.bbagen.2017.10.007

49. Wongsantichon J, Robinson RC, Ketterman AJ. Structural evidence for conformational changes of Delta class glutathione transferases after ligand binding. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2012;521: 77–83. doi:10.1016/j.abb.2012.03.023

50. Cocco R, Stenberg G, Dragani B, Principe DR, Paludi D, Mannervik B, et al. The Folding and Stability of Human Alpha Class Glutathione Transferase A1-1 Depend on Distinct Roles of a Conserved N-

capping Box and Hydrophobic Staple Motif. J Biol Chem. 2001;276: 32177–32183. doi:10.1074/jbc.M104057200

51. Rossjohn J, McKinstry WJ, Oakley AJ, Parker MW, Stenberg G, Mannervik B, et al. Structures of thermolabile mutants of human glutathione transferase P1-1 1 1Edited by R. Huber. Journal of Molecular Biology. 2000;302: 295–302. doi:10.1006/jmbi.2000.4054

52. Allocati N, Masulli M, Pietracupa M, Federici L, Di Ilio C. Evolutionarily conserved structural motifs in bacterial GST (glutathione S-transferase) are involved in protein folding and stability. Biochemical Journal. 2006;394: 11–17. doi:10.1042/BJ20051367

53. Liu H, Dong Y, Gao Y, Du Z, Wang Y, Cheng P, et al. The Fascinating Effects of Baicalein on Cancer: A Review. IJMS. 2016;17: 1681. doi:10.3390/ijms17101681

54. Bie B, Sun J, Guo Y, Li J, Jiang W, Yang J, et al. Baicalein: A review of its anti-cancer effects and mechanisms in Hepatocellular Carcinoma. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017;93: 1285–1291. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.068

55. Fang P, Yu M, Shi M, Bo P, Gu X, Zhang Z. Baicalin and its aglycone: a novel approach for treatment of metabolic disorders. Pharmacol Rep. 2020;72: 13–23. doi:10.1007/s43440-019-00024-x

56. Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. Nature. 1995;375: 397–400. doi:10.1038/375397a0

57. Conn S, Curtin C, Bézier A, Franco C, Zhang W. Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented Vitis vinifera L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. Journal of Experimental Botany. 2008;59: 3621–3634. doi:10.1093/jxb/ern217

58. Karplus PA, Diederichs K. Linking Crystallographic Model and Data Quality. Science. 2012;336: 1030–1033. doi:10.1126/science.1218231

59. Tickle IJ. Experimental determination of optimal root-mean-square deviations of macromolecular bond lengths and angles from their restrained ideal values. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2007;63: 1274–1281. doi:10.1107/S0907444907050196

## Figure legends

**Figure 1. Inhibition of GSH-conjugation activity carried by PtGSTU19 (upper panel) and U20 (lower panel) in the presence of baicalein.**
Inhibition tests were performed incubating enzyme (100 nM) with GSH (1 mM) and increasing concentration of BITC (0 to 700 µM) and baicalein at a fixed concentration of 0 (●), 1.5 (■), 3 (▲) and 15 (▼) µM.

**Figure 2. Crystal structures of PtGSTU19 and 20.**
**A.** View of the dimer of PtGSTU19 that shows the G-site. The backbone atoms (cartoon) are colored by monomer. GSH/OH is represented as grey sticks with the non-carbon atoms colored according to their types (red, oxygen; blue nitrogen; yellow, sulfur).
**B.** View of PtGSTU20 monomer that highlights both G- and H-sites. Glutathione (grey) occupies the G-site while baicalein (blue) occupies the H-site and in part the G-site. The backbone atoms (cartoon) are colored according to their secondary structure (cyan, helix; red, strand; magenta, loop).

**Figure 3. Structure-based sequence alignment of GSTUs highlighting common regions.**
The sequence alignment was generated with mTM-align. Sequences were retrieved from the RCSB PDB: PtGSTU19 (this study), PtGSTU20 (this study), RcGSTU (PDB ID 4j2f), TaGSTU4 (1gwc), OyGSTU (1oyj), GmGSTU4 (2vo4), GmGSTU10 (4chs), AtGSTU20 (5ecs), AtGSTU25 (5g5a), MiGSTU (5g5e), PtGSTU30 (5j4u), AtGSTU23 (6ep7). Secondary structures are labelled and shown using arrows (β-strands) and squiggles (helices). Common regions *i.e.* regions with no gaps and with pairwise residue distances less than 4Å are highlighted blue. Residues participating in dimer stabilization via polar interactions and marked with ■. Residues involved in binding glutathione (G-site) are marked with ▲. Residues involved in the baicalein stabilization are marked with ●.

**Figure 4. Views highlighting the difference between the apo-form and the GSH-complex of both PtGSTU19 and 20.**
**A.** Apo form of PtGSTU19. Nearly two thirds of the helix α6 was found in two conformation (1 in blue and 2 in yellow). Tyr160 and W161 residues were in quite distinct orientations in both conformations.
**B.** PtGSTU19 in complex with GSH/OH. Only the conformation 2 was observed. The side chain of Tyr160 points towards the glutathione molecule.
**C.** Apo form of PtGSTU20. Only conformation 1 was observed. Cys160 replaces Tyr160 of PtGSTU19. In the apo form, region 34 to 51 (helix α2 and its upstream and downstream loops) was not visible in the electron density maps.
**D.** PtGSTU20 in complex with GSH. The region 34 to 51 (helix α2 and its upstream and downstream loops) was visible in the electron density maps and adopts the same conformation as observed in PtGSTU19.

## Tables and figures

**Table 1. Kinetic parameters of PtGSTU19 and 20 toward model substrates.**

| | CDNB | PITC | BITC | PNP-butyrate | CuOOH | HNE |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $k_{cat}$ ($s^{-1}$) | | | | | | |
| **PtGSTU19** | 28.8 ± 2.2 | 3.8 ± 0.1 | 7.0 ± 0.1 | 0.04 ± 0.00 | 0.2 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 |
| **PtGSTU20** | 0.6 ± 0.0 | 5.1 ± 0.1 | 10.4 ± 0.3 | 0.02 ± 0.00 | 0.2 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 |
| $K_M$ (µM) | | | | | | |
| **PtGSTU19** | 3394 ± 502 | 48.4 ± 2.5 | 52.7 ± 3.6 | 443.5 ± 31.1 | 196.5 ± 31.1 | 56.4 ± 7.4 |
| **PtGSTU20** | 1777 ± 193 | 56.8 ± 4.1 | 149.6 ± 17.6 | 329.2 ± 28.1 | 98.6 ± 15.4 | 30.6 ± 3.5 |
| $k_{cat}/K_M$ ($10^3 M^{-1}.s^{-1}$) | | | | | | |
| **PtGSTU19** | 8.9 ± 0.8 | 79.0 ± 1.1 | 132.2 ± 0.2 | 0.1 ± 0.0 | 0.8 ± 0.0 | 2.0 ± 0.1 |
| **PtGSTU20** | 0.3 ± 0.0 | 88.9 ± 1.8 | 69.8 ± 2.2 | 0.1 ± 0.0 | 2.4 ± 0.1 | 3.6 ± 0.1 |

**Table 2. Statistics of X-ray diffraction data collection and model refinement.**

| | PtGSTU19 | | PtGSTU20 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Apo** | **GSH** | **Apo** | **GSH** | **Baicalein** |
| **Data collection** | | | | | |
| Diffraction source* | Proxima 1 | Proxima 2 | Proxima 2 | Proxima 2 | Proxima 1 |
| Detector | EIGER X 16M | EIGER X 9M | EIGER X 9M | EIGER X 9M | EIGER X 16M |
| Wavelength (Å) | 0.97857 | 0.98010 | 0.980106 | 0.98011 | 0.97856 |
| Space Group | $P4_12_12$ | $P4_12_12$ | $P4_12_12$ | $P4_12_12$ | $P4_12_12$ |
| Unit-cell parameters a,c (Å) | 56.8 ; 182.3 | 56.7 ; 182.0 | 56.0 ; 183.2 | 56.6 ; 181.6 | 56.1 ; 181.6 |
| Resolution Range (Å) | 41.5 1.6 (1.63 1.60) | 48.1 1.6 (1.64 1.61) | 47.8 2.0 (2.06 2.01) | 48.0 1.6 (1.67 1.64) | 47.7 2.1 (2.05 2.10) |
| Total No. of measured intensities | 719996 (26911) | 381726 (19190) | 517173 (34020) | 945416 (39869) | 493731 (34941) |
| Unique reflections | 40239 (1870) | 39646 (1927) | 20354 (1413) | 36971 (1740) | 19240 (1370) |
| Average redundancy | 18 (14) | 10 (10) | 25 (25) | 26 (23) | 26 (26) |
| Mean I/σ(I) | 22.5 (2.1) | 17.7 (2.3) | 31.8 (2.2) | 33.3 (2.4) | 35.2 (4.0) |
| Completeness (%) | 99.7 (95.2) | 99.9 (100) | 99.7 (96.1) | 99.8 (96.1) | 99.9 (98.2) |
| $R_{merge}$ | 0.068 (1.40) | 0.062 (0.67) | 0.057 (1.67) | 0.055 (1.44) | 0.053 (0.78) |
| $R_{meas}$ | 0.070 (1.45) | 0.066 (0.70) | 0.058 (1.71) | 0.056 (1.47) | 0.054 (0.81) |
| $CC_{1/2}$ | 0.999 (0.80) | 0.998 (0.94) | 1.000 (0.89) | 1.000 (0.83) | 1.000 (0.96) |
| **Refinement** | | | | | |
| Resolution Range (Å) | 41.5 1.6 | 48.1 1.6 | 47.8 2.0 | 48.0 1.6 | 47.7 2.1 |
| $R_{work}/R_{free}$ | 0.19 / 0.21 | 0.20 / 0.24 | 0.22 / 0.26 | 0.18 / 0.20 | 0.21 / 0.25 |
| Average Bfactor (Å$^2$) | 36.9 | 33.8 | 58.2 | 34.9 | 55.8 |
| No of protein atoms | 1892 | 1802 | 1579 | 1749 | 1570 |
| No of water molecules | 175 | 249 | 43 | 230 | 84 |
| **Model quality** | | | | | |
| RMSZ Bond lengths | 0.012 | 0.011 | 0.013 | 0.010 | 0.015 |
| RMSZ Bond angles | 1.117 | 1.090 | 1.181 | 1.063 | 1.177 |
| Ramachandran fav. (%) | 99.53 | 100 | 99.48 | 99.43 | 98.96 |
| Ramachandran out. (%) | 0.47 | 0 | 0.52 | 0.47 | 1.04 |
| Molprobity rotamer outliers (%) | 1.5 | 0.53 | 4.19 | 1.07 | 1.20 |
| Molprobity clashscore | 3.93 | 3.05 | 4.73 | 2.55 | 3.44 |
| Molprobity score | 1.64 | 1.30 | 2.10 | 1.35 | 1.63 |
| **PDB entry** | **XXXX** | **XXXX** | **XXXX** | **XXXX** | **XXXX** |

* All the data were collected on the synchrotron SOLEIL.

$R_{merge} = \sum_h \sum | (h) - \langle (h) \rangle | / \sum_h \sum (h)$. $R_{meas} = \sum_h \{ (h)/[ (h) - 1]\}^{1/2} \sum | (h) - \langle (h) \rangle | / \sum_h \sum (h)$. $CC_{1/2}$ is the correlation coefficient of the mean intensities between two random half-sets of data [58]. $R_{work} = \sum_h || | - | | | / \sum_h | |$. 5 % of reflections were selected for $R_{free}$ calculation. R.m.s.z. : root mean square Z-score [59]. The molprobity clashscore is the number of serious clashes per 1000 atoms [22]. The molprobity score is a log-weighted combination of the clashscore, percentage Ramachandran not favoured and percentage bad side-chain rotamers [14]. Values in parentheses are for highest resolution shell.

* All the data were collected on the synchrotron SOLEIL.

**Figure 1.**

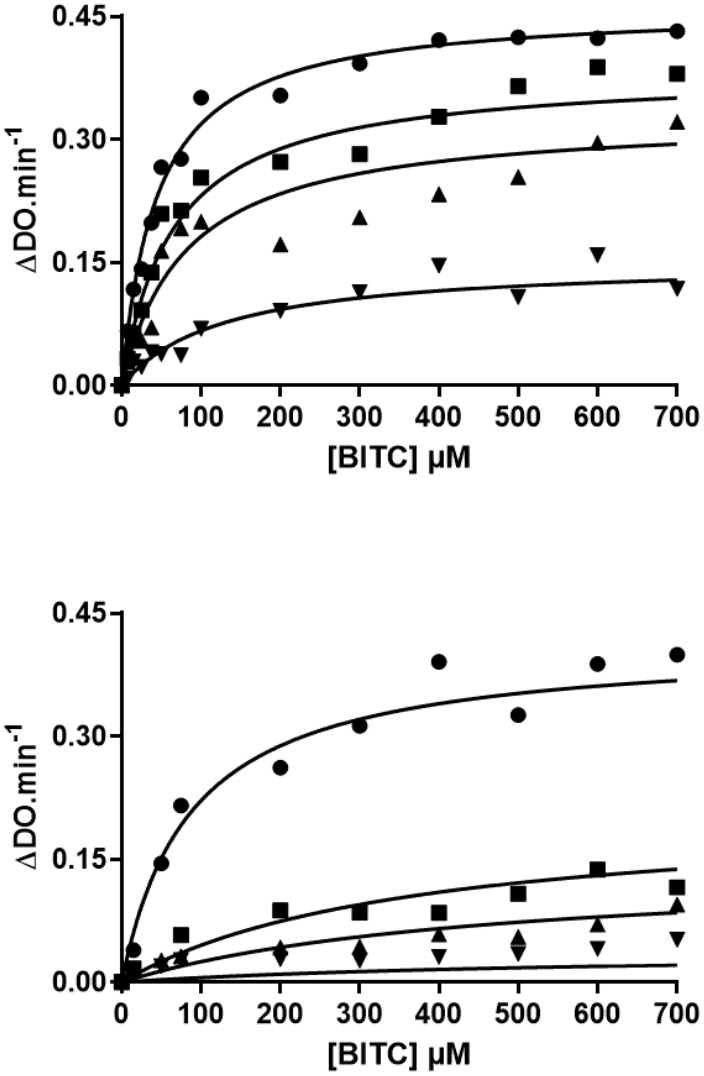

0.45
0.30
0.15
0.00
ΔDO.min-1
0
100
200
300
400
500
600
700
[BITC] µM
0.45
0.30
0.15
0.00
ΔDO.min-1
0
100
200
300
400
500
600
700
[BITC] µM

**Figure 2.**

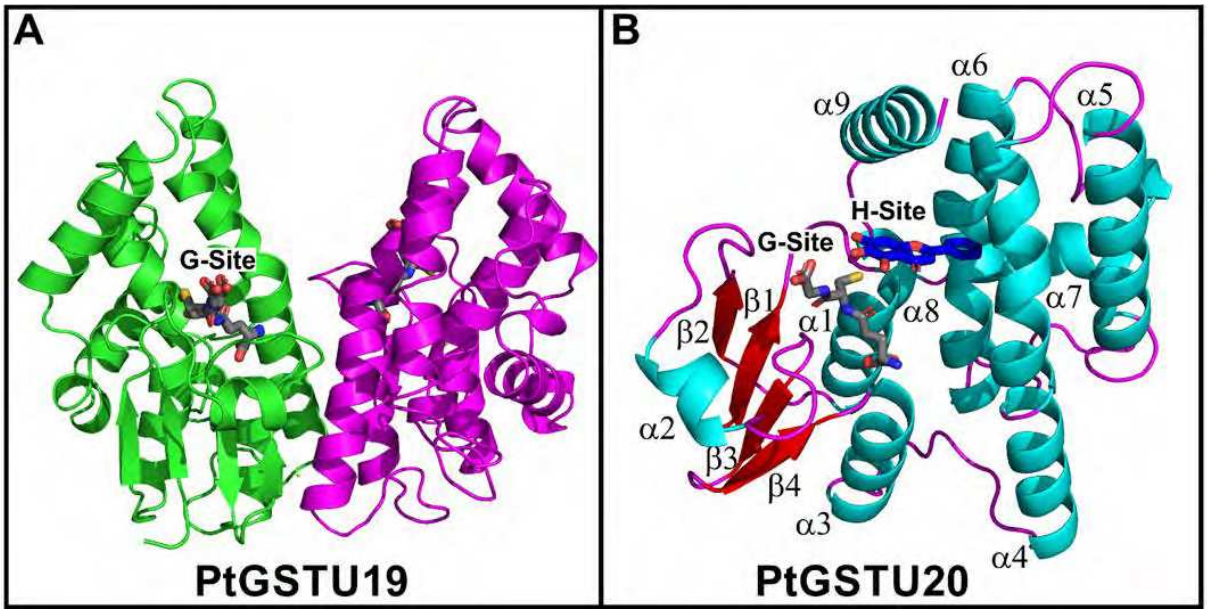

A
G-Site
PtGSTU19
B
α6
α9
α5
H-Site
G-Site
β1
α1
α8
α7
β2
α2
β3
β4
α3
α4
PtGSTU20

**Figure 3.**

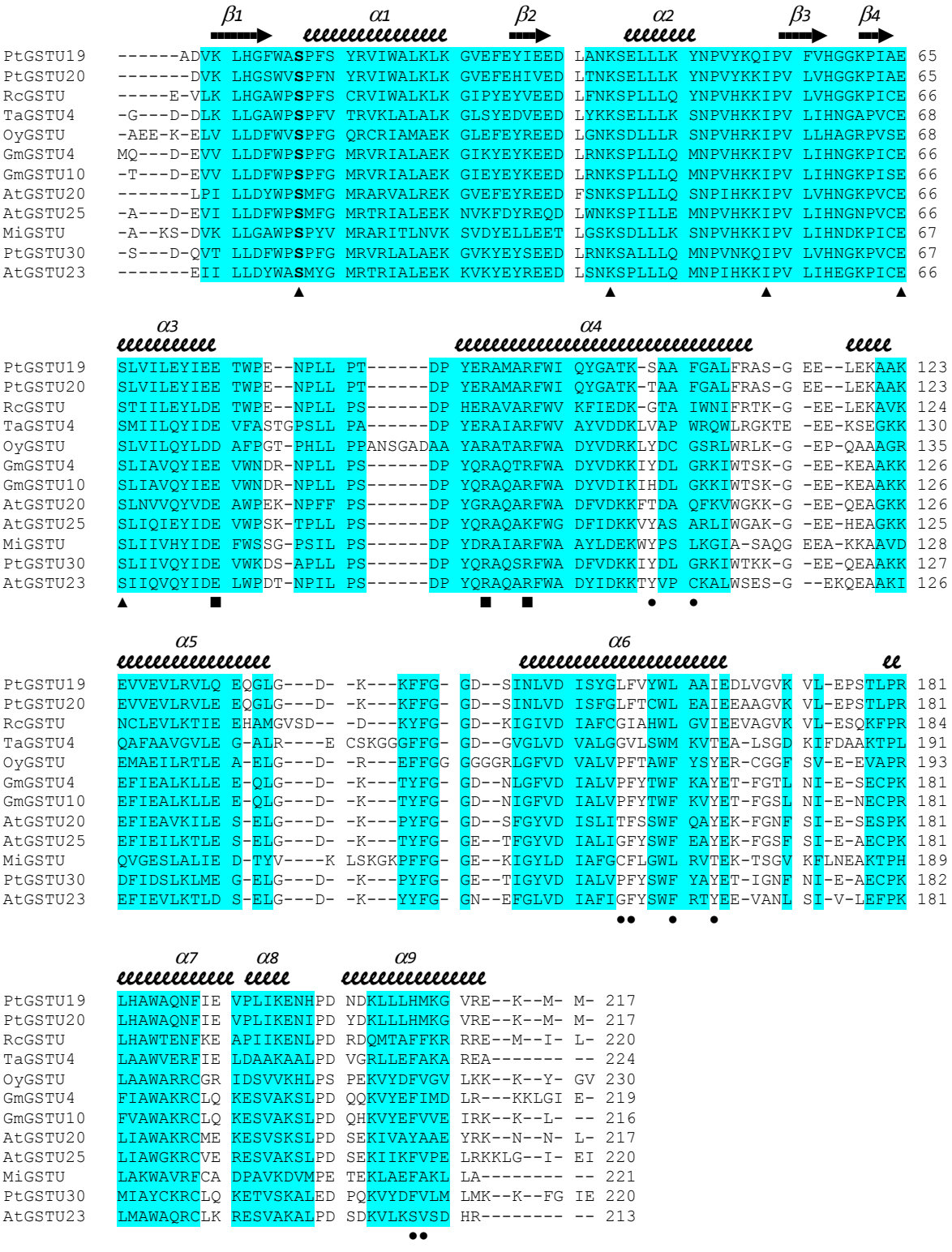
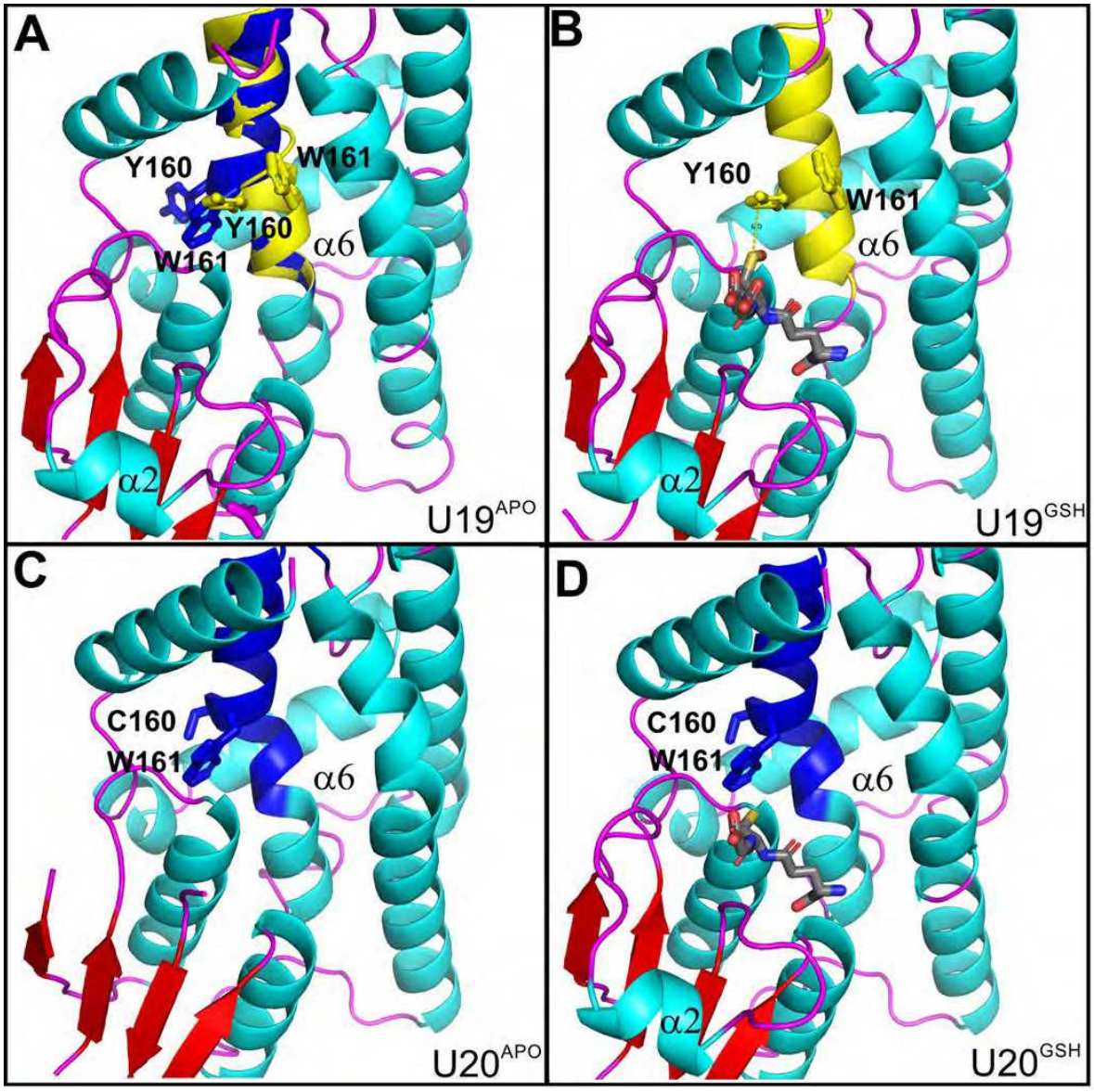

β1 α1 β2 α2 β3 β4
PtGSTU19 ------ADVK LHGFWASPFS YRVIWALKLK GVEFEYIEED LANKSELLLK YNPVYKQIPV FVHGGKPIAE 65
PtGSTU20 -------DVK LHGSWVSPFN YRVIWALKLK GVEFEHIVED LTNKSELLLK YNPVYKKIPV LVHGGKPIAE 65
RcGSTU -----E-VLK LHGAWPSPFS CRVIWALKLK GIPYEYVEED LFNKSPLLLQ YNPVHKKIPV LVHGGKPICE 66
TaGSTU4 -G---D-DLK LLGAWPSPFV TRVKLALALK GLSYEDVEED LYKKSELLLK SNPVHKKIPV LIHNGAPVCE 68
OyGSTU -AEE-K-ELV LLDFWVSPFG QRCRIAMAEK GLEFEYREED LGNKSDLLLR SNPVHRKIPV LLHAGRPVSE 68
GmGSTU4 MQ---D-EVV LLDFWPSPFG MRVRIALAEK GIKYEYKEED LRNKSPLLLQ MNPVHKKIPV LIHNGKPICE 66
GmGSTU10 -T---D-EVV LLDFWPSPFG MRVRIALAEK GIEYEYKEED LRNKSPLLLQ MNPVHKKIPV LIHNGKPISE 66
AtGSTU20 -------LPI LLDYWPSMFG MRARVALREK GVEFEYREED FSNKSPLLLQ SNPIHKKIPV LVHNGKPVCE 66
AtGSTU25 -A---D-EVI LLDFWPSMFG MRTRIALEEK NVKFDYREQD LWNKSPILLE MNPVHKKIPV LIHNGNPVCE 66
MiGSTU -A--KS-DVK LLGAWPSPYV MRARITLNVK SVDYELLEET LGSKSDLLLK SNPVHKKIPV LIHNDKPICE 67
PtGSTU30 -S---D-QVT LLDFWPSPFG MRVRLALAEK GVKYEYSEED LRNKSALLLQ MNPVNKQIPV LVHNGKPVCE 67
AtGSTU23 -------EII LLDYWASMYG MRTRIALEEK KVKYEYREED LSNKSPLLLQ MNPIHKKIPV LIHEGKPICE 66
α3 α4
PtGSTU19 SLVILEYIEE TWPE--NPLL PT------DP YERAMARFWI QYGATK-SAA FGALFRAS-G EE--LEKAAK 123
PtGSTU20 SLVILEYIEE TWPE--NPLL PT------DP YERAMARFWI QYGATK-TAA FGALFRAS-G EE--LEKAAK 123
RcGSTU STIILEYLDE TWPE--NPLL PS------DP HERAVARFWV KFIEDK-GTA IWNIFRTK-G -EE-LEKAVK 124
TaGSTU4 SMIILQYIDE VFASTGPSLL PA------DP YERAIARFWV AYVDDKLVAP WRQWLRGKTE -EE-KSEGKK 130
OyGSTU SLVILQYLDD AFPGT-PHLL PPANSGADAA YARATARFWA DYVDRKLYDC GSRLWRLK-G -EP-QAAAGR 135
GmGSTU4 SLIAVQYIEE VWNDR-NPLL PS------DP YQRAQTRFWA DYVDKKIYDL GRKIWTSK-G -EE-KEAAKK 126
GmGSTU10 SLIAVQYIEE VWNDR-NPLL PS------DP YQRAQARFWA DYVDIKIHDL GKKIWTSK-G -EE-KEAAKK 126
AtGSTU20 SLNVVQYVDE AWPEK-NPFF PS------DP YGRAQARFWA DFVDKKFTDA QFKVWGKK-G -EE-QEAGKK 126
AtGSTU25 SLIQIEYIDE VWPSK-TPLL PS------DP YQRAQAKFWG DFIDKKVYAS ARLIWGAK-G -EE-HEAGKK 125
MiGSTU SLIIVHYIDE FWSSG-PSIL PS------DP YDRAIARFWA AYLDEKWYPS LKGIA-SAQG EEA-KKAAVD 128
PtGSTU30 SLIIVQYIDE VWKDS-APLL PS------DP YQRAQSRFWA DFVDKKIYDL GRKIWTKK-G -EE-QEAAKK 127
AtGSTU23 SIIQVQYIDE LWPDT-NPIL PS------DP YQRAQARFWA DYIDKKTYVP CKALWSES-G --EKQEAAKI 126
α5 α6
PtGSTU19 EVVEVLRVLQ EQGLG---D- -K---KFFG- GD--SINLVD ISYGLFVYWL AAIEDLVGVK VL-EPSTLPR 181
PtGSTU20 EVVEVLRVLE EQGLG---D- -K---KFFG- GD--SINLVD ISFGLFTCWL EAIEEAAGVK VL-EPSTLPR 181
RcGSTU NCLEVLKTIE EHAMGVSD-- -D---KYFG- GD--KIGIVD IAFCGIAHWL GVIEEVAGVK VL-ESQKFPR 184
TaGSTU4 QAFAAVGVLE G-ALR----E CSKGGGFFG- GD--GVGLVD VALGGVLSWM KVTEA-LSGD KIFDAAKTPL 191
OyGSTU EMAEILRTLE A-ELG---D- -R---EFFGG GGGGRLGFVD VALVPFTAWF YSYER-CGGF SV-E-EVAPR 193
GmGSTU4 EFIEALKLLE E-QLG---D- -K---TYFG- GD--NLGFVD IALVPFYTWF KAYET-FGTL NI-E-SECPK 181
GmGSTU10 EFIEALKLLE E-QLG---D- -K---TYFG- GD--NIGFVD IALVPFYTWF KVYET-FGSL NI-E-NECPR 181
AtGSTU20 EFIEAVKILE S-ELG---D- -K---PYFG- GD--SFGYVD ISLITFSSWF QAYEK-FGNF SI-E-SESPK 181
AtGSTU25 EFIEILKTLE S-ELG---D- -K---TYFG- GE--TFGYVD IALIGFYSWF EAYEK-FGSF SI-E-AECPK 181
MiGSTU QVGESLALIE D-TYV----K LSKGKPFFG- GE--KIGYLD IAFGCFLGWL RVTEK-TSGV KFLNEAKTPH 189
PtGSTU30 DFIDSLKLME G-ELG---D- -K---PYFG- GE--TIGYVD IALVPFYSWF YAYET-IGNF NI-E-AECPK 182
AtGSTU23 EFIEVLKTLD S-ELG---D- -K---YYFG- GN--EFGLVD IAFIGFYSWF RTYEE-VANL SI-V-LEFPK 181
α7 α8 α9
PtGSTU19 LHAWAQNFIE VPLIKENHPD NDKLLLHMKG VRE--K--M- M- 217
PtGSTU20 LHAWAQNFIE VPLIKENIPD YDKLLLHMKG VRE--K--M- M- 217
RcGSTU LHAWTENFKE APIIKENLPD RDQMTAFFKR RRE--M--I- L- 220
TaGSTU4 LAAWVERFIE LDAAKAALPD VGRLLEFAKA REA------- -- 224
OyGSTU LAAWARRCGR IDSVVKHLPS PEKVYDFVGV LKK--K--Y- GV 230
GmGSTU4 FIAWAKRCLQ KESVAKSLPD QQKVYEFIMD LR---KKLGI E- 219
GmGSTU10 FVAWAKRCLQ KESVAKSLPD QHKVYEFVVE IRK--K--L- -- 216
AtGSTU20 LIAWAKRCME KESVSKSLPD SEKIVAYAAE YRK--N--N- L- 217
AtGSTU25 LIAWGKRCVE RESVAKSLPD SEKIIKFVPE LRKKLG--I- EI 220
MiGSTU LAKWAVRFCA DPAVKDVMPE TEKLAEFAKL LA-------- -- 221
PtGSTU30 MIAYCKRCLQ KETVSKALED PQKVYDFVLM LMK--K--FG IE 220
AtGSTU23 LMAWAQRCLK RESVAKALPD SDKVLKSVSD HR-------- -- 213

**Figure 4.**


A
Y160
W161
Y160
W161
α6
α2
U19APO
B
Y160
W161
α6
α2
U19GSH
C
C160
W161
α6
U20APO
D
C160
W161
α6
α2
U20GSH

# Supporting information

**Figure legends**

**Table S1. Oligonucleotides used in the study.**

**Table S2. List of metabolites used for thermal shift assays.**

**Table S3. Kinetic parameters of PtGSTU19 and 20 variants toward model substrates.**

**Figure S1. Genetic map displaying GST genes over *Populus trichocarpa* chromosomes and scaffolds.**
Poplar GST genes have been mapped over the 19 chromosomes and corresponding scaffolds using the V3 assembly of *Populus trichocarpa* genome available on Phytozome website (version 12). Gene names as well as chromosomes (ChrXX) and scaffold (scaffold_XX) numbers are indicated. Genes on the antisense strand are underlined. This figure has been prepared with MapChart software (Voorrips 2002) according to the following color code: **GSTL** (dark red), **GHR** (red), **DHAR** (orange), **mPGES2** (yellow), **GSTU** (light green), **GSTF** (green), **GSTT** (cyan), **GSTZ** (blue), **EF1Bγ** (dark blue), **MTX** (purple), **TCHQD** (black).

**Figure S2. Phylogenetic tree of poplar GSTUs.**
Primary sequences of poplar GSTUs were retrieved from *Populus trichocarpa* genome (v3 assembly) and aligned with Clustal Omega implemented in Seaview software (Gouy et al., 2010). The phylogenetic tree was then built using the BioNJ software after curing alignment from hypervariable regions with GBlocks software (Seaview). The robustness of the tree was assessed by the bootstrap method (500 replications). The scale corresponds to 0.2 substitution per site.

**Figure S3. Purification of PtGSTU19 and PtGSTU20.**
**A.** Coomassie blue-stained sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of total (T), soluble (S), insoluble (I) protein fraction from *E. coli* BL21 (DE3) pSBET propagating PtGSTU19 (left) or PtGSTU20 (right)-producing plasmid grown in absence or presence of 0.1 mM IPTG. Fractions collected during ammonium sulfate precipitation step (0%-40% and 40%-80%), size-exclusion chromatography (SEC) and ion-exchange chromatography (IEC) were also presented. MM: molecular mass marker.
**B.** Purified PtGSTU19 (left) and PtGSTU20 (right) proteins (300 µg in 300 µl of lysis buffer) were analyzed by SEC-MALS using an analytical Superdex200 10/300 column connected to a multi-angle light scattering (MALS) detector (miniDAWN TREOS, Wyatt technology) and a refractometer (T-rEX, Wyatt Technology). Data were processed using Astra 7 software (Wyatt Technology).
**C.** Molecular masses of purified PtGSTU19 and 20 deduced from primary sequences and determined by mass spectrometry using a Bruker microTOF-Q spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an Apollo II electrospray ionization source with an ion funnel and operated in the negative ion mode. Ability to bind GS-sepharose is also indicated.

**Tables and figures**

**Table S1. Primers used in this study**

| Name | Sequence |
|---|---|
| **PtGSTU19 (Potri.008G174900)** | |
| **PtGSTU19/20-B*sm*BI/*Nco*I-For** | 5′-ccccccgtctcccatggcagatgtgaagctgcat-3' |
| **PtGSTU19/20-B*am*HI-Rev** | 5′-ccccggatccctacttgttcatcattttc-3' |
| **PtGSTU20 (Potri.008G175000)** | |
| **PtGSTU19/20-N*co*I-For** | 5′-ccccccgtctcccatggcagatgtgaagctgcat-3' |
| **PtGSTU19/20-B*am*HI-Rev** | 5′-ccccggatccctacttgttcatcattttc-3′ |
| **PtGSTU19Y160A** | |
| **PtGSTU19 Y160A For** | 5'-tggctgcaagccaagcaacgaatagtccatacgagatgtcaa-3' |
| **PtGSTU19 Y160A Rev** | 5'-ttgacatctcgtatggactattcgttgcttggcttgcagcca-3' |
| **PtGSTU19Y160C** | |
| **PtGSTU19 Y160C For** | 5'-ggctgcaagccaacaaacgaatagtccatacgagatgt-3' |
| **PtGSTU19 Y160C Rev** | 5'-acatctcgtatggactattcgtttgttggcttgcagcc-3' |
| **PtGSTU19Y160F** | |
| **PtGSTU19 Y160F For** | 5'-ggctgcaagccaaaaaacgaatagtccatacgagatgt-3' |
| **PtGSTU19 Y160F Rev** | 5'-acatctcgtatggactattcgtttttggcttgcagcc-3' |
| **PtGSTU20C160Y** | |
| **PtGSTU20 C160Y For** | 5'- ggcttcaagccaataagtgaagagtccaaatgagatgt-3' |
| **PtGSTU20 C160Y Rev** | 5'- acatctcatttggactcttcacttattggcttgaagcc-3' |

**Table S2. List of metabolites used for thermal shift assays.**

| Metabolites | Metabolites | Metabolites |
|---|---|---|
| (−)-Epicatechin | 4,4'-dihydroxybenzophenone | Gallotannin |
| 1,4 benzoquinone | 4-amino-naphtalen-1-ol | Indole-3-carboxaldehyde |
| 1-bromo-2,4,6-triisopropylbenzene | 4-aminotoluene-3-sulfonic acid | Isopimpinellin |
| 1-chloro-2,4-dinitrobenzene | 4-chloro-3-nitrobenzoic acid | Menadione |
| 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid | 4-nitrocatechol | Morine |
| 2,2',4,4' tetrahydroxybenzophenone | Acetosyringone | Oxidized glutathione |
| 2,3-dihydroxybenzoic acid | Anthrone | Phenyl isothiocyanate |
| 2,4 dihydroxybenzophenone | Ascorbic acid | Phenylacetophenone-SG |
| 2,4-dichlorophenoxyacetic acid | Baicalein | Piceol |
| 2,4-Pentanedione peroxide 34% | Butylated hydroxytoluene | p-xylene-2-sulfonic acid |
| 2,6 dichloro 1,4 benzoquinone | Catechin hydrate | (2R,3R)-Dihydroquercetin |
| 2-bromo-1,1,3-trimethoxypropane | Coniferaldehyde | Resorcinol |
| 2-bromo-1-tetralone | Cumene hydroperoxide | Sinapic acid |
| 2-bromo-2,6-dimethoxybiphenyl | Cyclobutane malonyl peroxide | Syringaldehyde |
| 2-bromo-2-phenylacetophenone | Deoxycholic acid | Taxifoline |
| 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate | Esculetin | Tert-butyl Hydroperoxyde |
| 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone | Fraxetin | Vanillic acid |
| 3-(dimethylamino)benzoic acid | Gallic acid | Vanillin |

**Table S3. Kinetic parameters of PtGSTU19 and 20 variants toward model substrates.**

| | CDNB | PITC | BITC | PNP-butyrate | CuOOH |
|---|---|---|---|---|---|
| $k_{cat}$ ($s^{-1}$) | | | | | |
| **PtGSTU19** | 28.8 ± 2.2 | 3.8 ± 0.1 | 7.0 ± 0.1 | 0.04 ± 0.001 | 0.17 ± 0.01 |
| **PtGSTU19 Y160A** | 7.2 ± 0.9 | 2.3 ± 0.03 | 6.5 ± 0.2 | 0.05 ± 0.002 | 0.33 ± 0.02 |
| **PtGSTU19 Y160C** | 14.0 ± 1.2 | 3.05 ± 0.05 | 6.7 ± 0.1 | 0.05 ± 0.002 | 0.45 ± 0.03 |
| **PtGSTU19 Y160F** | 17.3 ± 1.0 | 3.9 ± 0.07 | 8.3 ± 0.2 | 0.05 ± 0.002 | 0.49 ± 0.01 |
| **PtGSTU20** | 0.59 ± 0.03 | 5.1 ± 0.1 | 10.4 ± 0.3 | 0.02 ± 4.10-4 | 0.24 ± 0.01 |
| **PtGSTU19 C160Y** | 0.59 ± 0.03 | 2.03 ± 0.08 | 4.9 ± 0.1 | 0.02 ± 0,001 | 0.14 ± 0.01 |
| $K_M$ (µM) | | | | | |
| **PtGSTU19** | 3394 ± 502 | 48.4 ± 2.5 | 52.7 ± 3.6 | 443.5 ± 31.1 | 196.5 ± 31.1 |
| **PtGSTU19 Y160A** | 7042 ± 1379 | 49.2 ± 2.6 | 30.6 ± 4.5 | 534.6 ± 68.1 | 701.3 ± 82.7 |
| **PtGSTU19 Y160C** | 4158 ± 620 | 40.3 ± 3.0 | 54.1 ± 3.3 | 518.3 ± 57.6 | 1265 ± 139.7 |
| **PtGSTU19 Y160F** | 3665 ± 390 | 31.1 ± 2.5 | 36.28 ± 3.3 | 693.2 ± 63.8 | 347.1 ± 34.6 |
| **PtGSTU20** | 1777 ± 193 | 56.8 ± 4.1 | 149.6 ± 17.6 | 329.2 ± 28.1 | 98.6 ± 15.4 |
| **PtGSTU19 C160Y** | 2247 ± 229 | 58.3 ± 9.2 | 71.4 ± 9.6 | 326.2 ± 67.6 | 490.5 ± 97.5 |
| $k_{cat}/K_M$ ($10^3 M^{-1}.s^{-1}$) | | | | | |
| **PtGSTU19** | 8.9 ± 0.8 | 79.0 ± 1.1 | 132.2 ± 0.2 | 0.1 ± 0.002 | 0.85 ± 0.04 |
| **PtGSTU19 Y160A** | 1.02 ± 0.13 | 46.8 ± 0.6 | 211.9 ± 6.2 | 0.09 ± 0.004 | 0.48 ± 0.02 |
| **PtGSTU19 Y160C** | 3.37 ± 0.29 | 75.6 ± 1.4 | 124.2 ± 1.7 | 0.1 ± 0.003 | 0.36 ± 0.02 |
| **PtGSTU19 Y160F** | 4.68 ± 0.27 | 125.7 ± 2.1 | 229.4 ± 4.5 | 0.08 ± 0.003 | 1.41 ± 0.04 |
| **PtGSTU20** | 0.33 ± 0.01 | 88.9 ± 1.8 | 69.8 ± 2.2 | 0.05 ± 0.001 | 2.4 ± 0.1 |
| **PtGSTU19 C160Y** | 0.26 ± 0.01 | 34.9 ± 1.4 | 68.8 ± 1.8 | 0.06 ± 0003 | 0.28 ± 0.02 |

**Figure S1.**

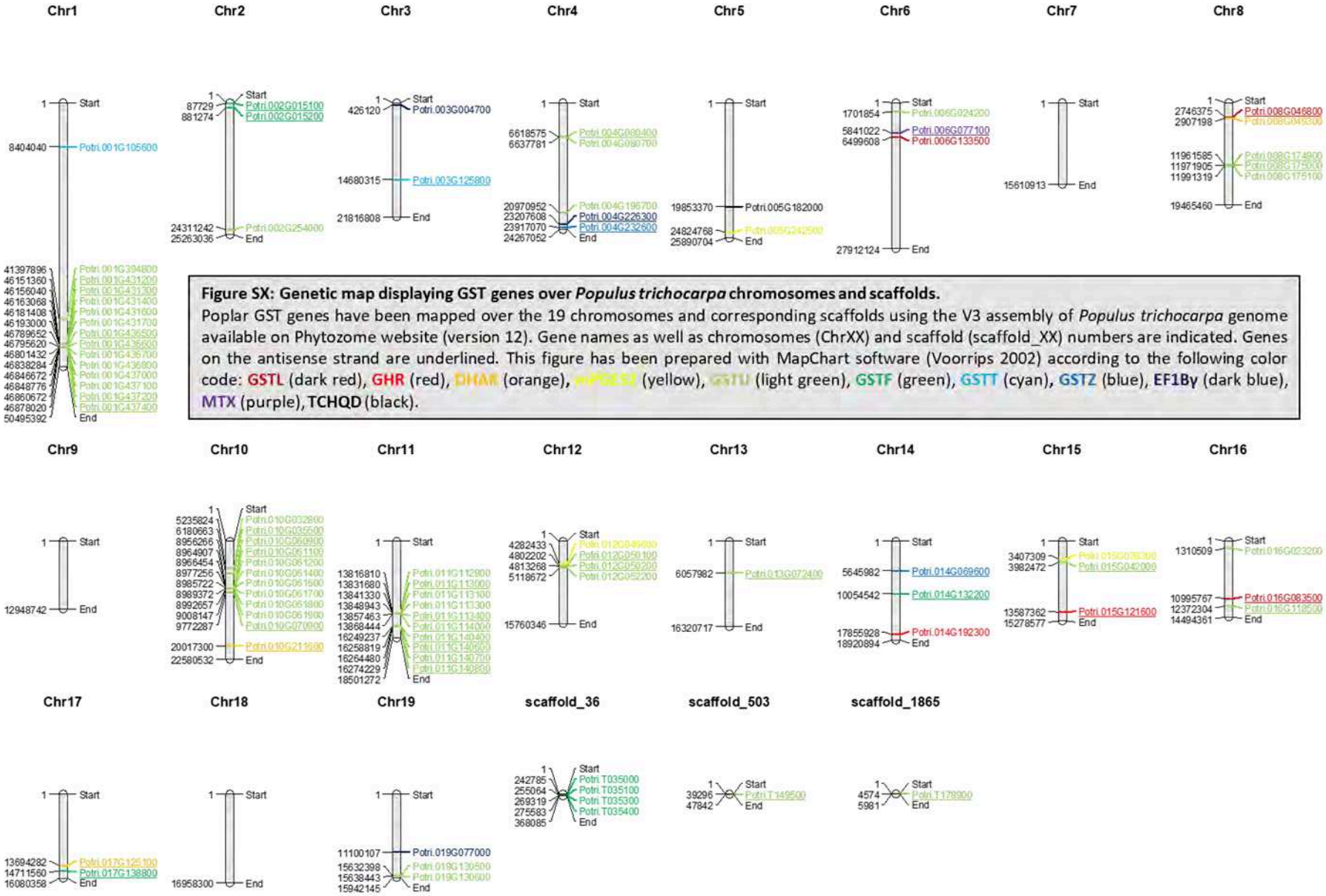



**Figure SX: Genetic map displaying GST genes over *Populus trichocarpa* chromosomes and scaffolds.**
Poplar GST genes have been mapped over the 19 chromosomes and corresponding scaffolds using the V3 assembly of *Populus trichocarpa* genome available on Phytozome website (version 12). Gene names as well as chromosomes (ChrXX) and scaffold (scaffold_XX) numbers are indicated. Genes on the antisense strand are underlined. This figure has been prepared with MapChart software (Voorrips 2002) according to the following color code: **GSTL** (dark red), **GHR** (red), **DHAR** (orange), **[illegible]** (yellow), **GSTU** (light green), **GSTF** (green), **GSTT** (cyan), **GSTZ** (blue), **EF1Bγ** (dark blue), **MTX** (purple), **TCHQD** (black).

**Figure S2.**

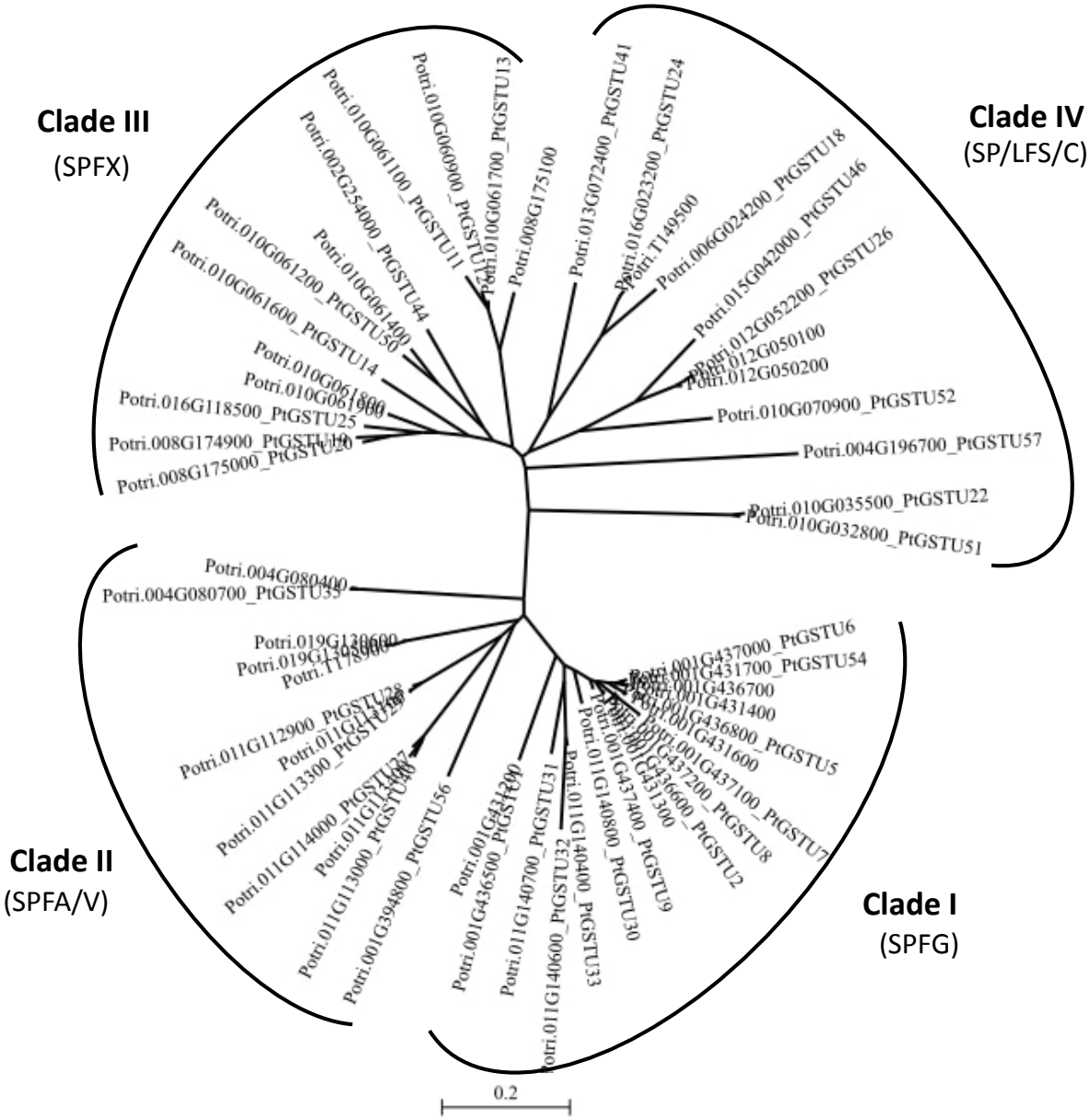
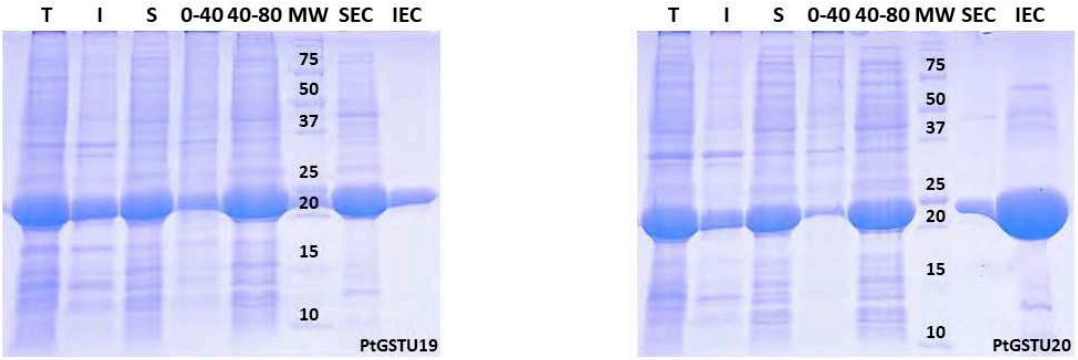
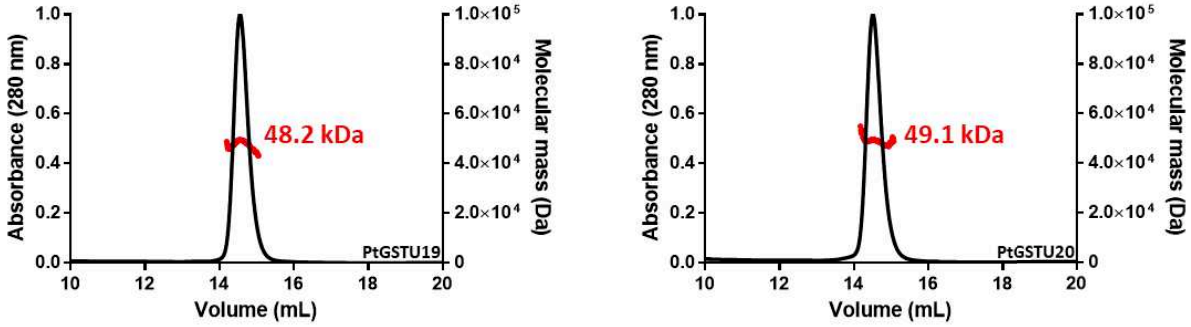

Clade III
(SPFX)
Clade IV
(SP/LFS/C)
Clade II
(SPFA/V)
Clade I
(SPFG)
Potri.010G060900_PtGSTU13
Potri.010G061100_PtGSTU11
Potri.002G254000_PtGSTU44
Potri.010G061400
Potri.010G061200_PtGSTU50
Potri.010G061600_PtGSTU14
Potri.010G061800
Potri.016G118500_PtGSTU25
Potri.008G174900_PtGSTU19
Potri.008G175000_PtGSTU20
Potri.010G061700_PtGSTU13
Potri.008G175100
Potri.013G072400_PtGSTU41
Potri.016G023200_PtGSTU24
Potri.T149500
Potri.006G024200_PtGSTU18
Potri.015G042000_PtGSTU46
Potri.012G052200_PtGSTU26
Potri.012G050100
Potri.012G050200
Potri.010G070900_PtGSTU52
Potri.004G196700_PtGSTU57
Potri.010G035500_PtGSTU22
Potri.010G032800_PtGSTU51
Potri.004G080400
Potri.004G080700_PtGSTU39
Potri.019G130600
Potri.019G130900
Potri.T178900
Potri.011G112900_PtGSTU28
Potri.011G113300_PtGSTU27
Potri.011G114000_PtGSTU29
Potri.011G113000_PtGSTU40
Potri.001G394800_PtGSTU56
Potri.001G436500_PtGSTU1
Potri.011G140700_PtGSTU31
Potri.011G140600_PtGSTU32
Potri.011G140400_PtGSTU33
Potri.011G140800_PtGSTU30
Potri.001G437400_PtGSTU9
Potri.001G431300
Potri.001G436600_PtGSTU2
Potri.001G437200_PtGSTU8
Potri.001G437100_PtGSTU7
Potri.001G436800_PtGSTU5
Potri.001G431600
Potri.001G436700
Potri.001G431400
Potri.001G431700_PtGSTU54
Potri.001G437000_PtGSTU6
0.2

**Figure S3.**

**A.**




**B.**




**C.**

| Protein | Theoretical molecular mass (Da) | Measured molecular mass (Da) | Δ mass (Da) | Apparent molecular mass (Da) | Retention on GSH-sepharose |
|---|---|---|---|---|---|
| **PtGSTU19** | 25024.03 | 24892.56 | -131.47 | 48200 | Partially |
| **PtGSTU20** | 24927.01 | 24796.09 | - 130.92 | 49100 | No |

# Chapitre I II : La recherche de ligands et  ubstrats des GSTUs

La caractérisation des GSTUs d'*A. thaliana* et de *P. trichocarpa* s'est poursuivie par la recherche de leurs ligands et substrats parmi divers métabolites spécialisés. L'emploi d'une méthode de criblage haut débit de dénaturation thermique par fluorescence a été privilégié. Cette méthode repose sur le suivi de la thermostabilité des protéines d'intérêt en présence de ligands potentiels. En effet la fixation d'un ligand sur la protéine peut engendrer une modification de l'état natif de celle-ci. La stabilisation
ou la déstabilisation de la protéine sera alors matérialisée par une augmentation ou une diminution de sa température de fusion ($T_m$). La température de fusion ou température de demi-dénaturation correspond à la température à laquelle 50 % de la protéine est dénaturée. La comparaison des températures de fusion d'une protéine incubée en présence ou en absence de ligand permet d'apprécier les interactions protéine/ligand. Le criblage a été réalisé à l'aide d'une banque constituée de molécules disponibles au laboratoire.

La banque de molécules utilisée lors de nos expériences d'interaction AtGSTU/ligand, était constituée majoritairement de (furo)coumarines. Le choix des (furo)coumarines s'explique notamment par le fait que ces molécules sont retrouvées dans de nombreuses plantes. Il s'agit en particulier de la bergaptène, l'isopimpinelline, la byakangélicine ou l'auraptène (Pathak *et al.*, 1962; Bourgaud *et al.*, 2006; Dugrand-Judek *et al.*, 2015) et de l'esculétine, scopolétine, fraxétine qui sont présentes dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* (Schmid *et al.*, 2014; Sisó-Terraza *et al.*, 2016).

Les 9 isoformes de GSTUs (AtGSTU1, 6, 7, 8, 16, 19, 22, 24 et 25) d'intérêt ont été soumises au test de thermostabilité contre 54 molécules dont notamment 50 (furo)coumarines et dont la liste figure en annexe (Tableau A10). L'utilisation de GSH ou encore de CDNB (co-substrat et substrat respectivement) nous a permis de conclure que ce n'est pas tant l'effet stabilisateur ou déstabilisateur qui est important pour confirmer une interaction entre la molécule testée et la protéine mais plutôt l'intensité du déplacement thermique observé. En effet le GSH possède un effet stabilisateur ($\Delta T_m$ de 6,1°C) sur AtGSTU19 alors qu'il est déstabilisateur ($\Delta T_m$ de -1,6°C) sur AtGSTU7. De la même manière le CDNB engendre une stabilisation de AtGSTU19 ($\Delta T_m$ de 1,2°C) et une déstabilisation de AtGSTU7 ($\Delta T_m$ de -2,9°C). Ces résultats soulignent également que l'effet stabilisateur ou déstabilisateur n'est pas intrinsèque à une molécule donnée. En ce qui concerne les (furo)coumarines, AtGSTU7 et AtGSTU19 ne semblent interagir qu'avec une seule des 50 (furo)coumarines testées (100 µM) respectivement avec l'isobergaptène ($\Delta T_m$ de -2,4°C) et l'esculétine ($\Delta T_m$ de -5,3°C) dont l'effet est déstabilisateur sur ces protéines. Les autres AtGSTUs étudiées semblent également lier des (furo)coumarines de type lanatine, 6,7-dihydroxybergamottine, isobergaptène, bergamottine, esculétine ou isoimpératorine. Toutes ces molécules ont un effet déstabilisateur à une concentration de 100 µM bien que l'isobergaptène ait aussi un effet stabilisateur sur certaines AtGSTUs.
En ce qui concerne les isoformes AtGSTU16 et AtGSTU25 utilisées comme contrôles, la première semble interagir avec 39 des 50 (furo)coumarines testées. La protéine AtGSTU25 n'étant pas stable en absence de son co-substrat GSH, il n'a pas été possible d'observer une interaction directe entre les (furo)coumarines et cette protéine. Bien que ces résultats soient prometteurs quant à une potentielle interaction des protéines AtGSTUs avec des coumarines, le seuil utilisé pour déterminer qu'une valeur est significative reste subjectif. En effet ces expériences n'ont pas été réalisées en triplicat du fait notamment de la faible quantité de molécule disponible.

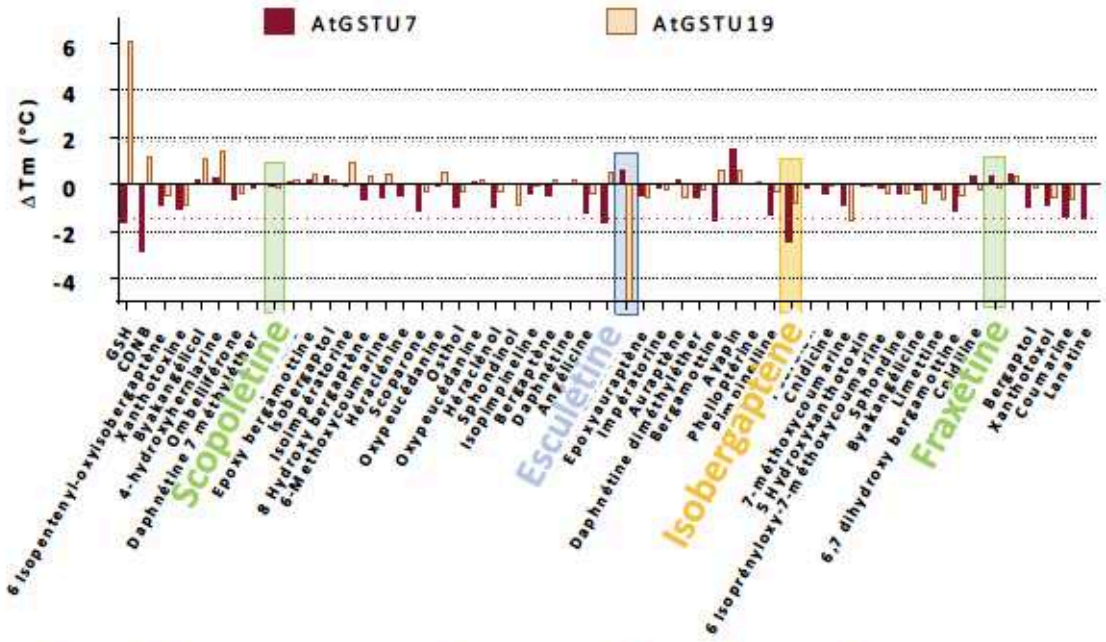



**Figure 18 : Effet des coumarines sur la thermostabilité des GSTU7 et 19 d'*Arabidopsis thaliana*.**
L'effet des molécules testées sur la thermostabilité des protéines est symbolisé par un déplacement thermique ($\Delta T_m$). Les interactions (furo)coumarines/AtGSTU7 sont représentées en marron alors que les interactions (furo)coumarines/AtGSTU19 le sont en beige. Les coumarines accumulées dans les racines d'un mutant *pdr9-2* lors d'une carence en fer (Fourcroy et al. 2014) sont représentées en vert et bleu.

# Discussion et perspectives

# Discussion et perspectives

Ce projet de thèse, réalisé au sein de l'équipe Réponse aux stress et régulation redox de l'UMR 1136, s'est inscrit dans un projet global de caractérisation des glutathion transférases de plante. L'objectif de ce travail était de déterminer le rôle de quelques GSTs de la classe tau chez les organismes modèles arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) et peuplier (*Populus trichocarpa*). Mes travaux se sont orientés d'une part vers l'étude des propriétés catalytiques de ces enzymes et d'autre part vers l'identification de leurs ligands et/ou substrats potentiels. En mêlant des approches biochimiques et structurales, les différents résultats obtenus au cours de cette thèse ont mis en exergue la capacité de ces enzymes à conjuguer des molécules de glutathion sur différents substrats à l'instar des autres GSTs à sérine conservée. Ces mêmes résultats suggèrent que les GSTUs étudiées sont capables d'interagir avec de nombreux métabolites de par leur fonction ligandine. Les résultats générés au cours de ce projet seront discutés dans les paragraphes suivants et différentes perspectives de travail seront proposées à l'issue de cette discussion.

## Chapitre I : Les GSTUs présentent des propriétés caractéristiques des GSTs canoniques à sérine conservée

Les activités de conjugaison de glutathion et de réduction de peroxydes des GSTUs d'arabette et de peuplier ont été testées contre différents substrats modèles. Les protéines AtGSTU1, 6, 7, 8, 16, 19, 22, 24 et 25 sont actives et présentent toutes des activités de conjugaison de GSH contre le CDNB et le PITC. A l'exception de la protéine AtGSTU7, ces GSTUs possèdent toutes une activité de réduction du CuOOH. Par contre, elles ne sont pas en mesure de réduire le tBOOH ou $H_2O_2$. De façon générale, l'analyse des activités enzymatiques des protéines AtGSTUs révèle la présence d'une signature enzymatique en corrélation avec la phylogénie de ces enzymes. L'activité de conjugaison de GSH des GSTUs de peuplier a été mesurée contre les substrats CDNB, PITC et contre le BITC, le PNP-butyrate et le HNE. Bien que les GSTUs de peuplier portent globalement une activité de conjugaison du GSH vis-à-vis du CDNB et des isothiocyanates, ces dernières ne sont pas toutes en mesure de catalyser tous les substrats testés. Ainsi seules les GSTUs de peuplier des clades II et III (respectivement la PtGSTU27 et les PtGSTU19 et 20), sont capables de conjuguer du GSH sur le 4-HNE qui est un produit issu de la peroxydation des lipides. Cette implication dans la détoxication des EORs en lien avec le 4-HNE a déjà été décrite pour quelques GSTs de classes Tau et Alpha entres autres (Sharma *et al.,* 2004; Awasthi *et al.,* 2005; Rocha-Santos *et al.,* 2018). Concernant l'activité de réduction de peroxyde, le comportement des GSTUs de peuplier est similaire à celui des GSTUs d'arabette. De manière générale, peu de GSTUs sont en mesure de réduire tBOOH et $H_2O_2$ au vu de la littérature. Lorsqu'elles en sont capables, cette activité est souvent plus faible que celle mesurée contre le CuOOH (Axarli *et al.,* 2009; Chronopoulou *et al.,* 2012).

Quel que soit leur clade d'appartenance ou même l'organisme dont les GSTUs sont issues, les paramètres cinétiques mesurés pour ces enzymes sont similaires (de l'ordre de $10^2$ à $10^7$ $M^{-1}.s^{-1}$ pour l'activité de conjugaison de GSH et de l'ordre de $10^2$ à $10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$ pour l'activité peroxydase) (Cummins *et al.,* 2003; Axarli *et al.,* 2009; Lo Piero *et al.,* 2010; Chronopoulou *et al.,* 2012; 2014; Liu *et al.,* 2013; Valenzuela-Chavira *et al.,* 2017). Lorsqu'on compare ces valeurs avec celles des Ser-GSTs de plante, d'insecte, de champignon ou encore de mammifère (Gonzalez *et al.,* 2018; Hu *et al.,* 2020; Sawicki *et al.,* 2003; Pégeot *et al.,* 2017; Mathieu *et al.,* 2013; Wang *et al.,* 2011), on peut constater que celles-ci sont proches, plaçant ainsi les GSTUs au même rang que toutes les autre GSTs à sérine.

Bien que sur le plan catalytique les GSTUs soient des GSTs à sérine classiques, ces dernières présentent quelques spécificités sur le plan structural que nous avons présentées dans l'article 1 présenté en introduction de cette thèse (Sylvestre-Gonon *et al.,* 2019). Parmi ces spécificités peuvent être notamment citées la présence d'une hélice α9 supplémentaire impliquée dans la fixation de substrats ou encore l'interface de dimérisation plus étroite que celle des GSTs d'autres classes. Outre ces particularités, les GSTUs présentent d'autres singularités ayant compliqué la résolution des structures tridimensionnelles des GSTUs d'intérêt.

# Chapitre II : D'une stabilité à fleur de peau à la résolution de structures tridimensionnelles

A ce jour, près de 600 structures tridimensionnelles de GSTs ont été résolues parmi lesquelles 10 % proviennent d'organismes photosynthétiques. Ainsi, les structures de 30 GSTs de plantes dont une dizaine de GSTUsont été déposées dans la base de données structurales PDB (Protein Data Bank). Actuellement la plupart des structures de GSTUs résolues correspond à des protéines sous la forme d'apoenzyme ou sous forme d'holoenzyme résultat d'une complexation avec du glutathion. Dans un souci d'accroitre les connaissances structurales sur les GSTUs, nous avons entrepris l'étude structurale de quelques GSTUs en collaboration avec l'équipe BioMod du laboratoire CRM². L'obtention d'une protéine stable étant une condition sine qua non à la cristallisation de cette dernière, il nous est apparu légitime de débuter la cristallogenèse avec ces protéines. Ainsi, sur les 16 GSTUs sélectionnées initialement, un total de 15794 essais de cristallogenèse ont été réalisés sur la GSTU1 de *Zea may*s (GST connue pour lier des porphyrines *in vitro*), sur cinq des 9 GSTUs d'*A. thaliana* et sur 5 des 6 GSTUs de *P. trichocarpa*. Ces essais avaient pour objectif d'aboutir à la résolution des structures tridimensionnelles des GSTUs par cristallographie couplée à la diffraction aux rayons X afin d'étudier les relations structure/fonction de ces enzymes. Ils avaient également pour but de caractériser au niveau moléculaire les interactions de ces protéines avec leurs potentiels ligands et/ou substrats. La majorité des protéines AtGSTUs étant instables sur le long terme, leur caractérisation structurale n'a pas abouti à la résolution de leur structure tridimensionnelle. Les protéines AtGSTUs étudiées et la ZmGSTU1 ont toutes été produite sous la forme d'une protéine recombinante étiquetée par une étiquette poly-histidine C-terminale facilitant leur purification contrairement aux 6 isoformes de peuplier qui en sont dépourvue. Parmi ces 6 dernières isoformes, 4 ont été cristallisées avec succès et leur structure résolue ou en cours d'affinement. Au vu de ces résultats, notre première interprétation fut que la présence et la position de l'étiquette poly-histidine pouvaient impacter la stabilité et/ou la cristallisation des protéines comme cela a déjà été documenté pour de nombreuses protéines (Carson *et al.,* 2007; Li *et al.,* 2013). En effet la plupart des GSTUs dont la structure a été déposée dans la PDB ne possèdent aucune étiquette ou sont étiquetées à leur extrémité N-terminale. Nous avons donc entrepris de produire et de purifier un variant étiqueté en position N-terminale et d'un autre non étiqueté de la protéine AtGSTU8. Cependant aucun cristal n'a été obtenu dans ce cas malgré une multitude d'essais. Nos collaborateurs ont néanmoins réussi à obtenir des données de diffraction pour la protéine AtGSTU7 étiquetée en position C-terminale suggérant que la présence d'une étiquette n'est probablement pas le seul facteur influençant la cristallogenèse. En effet, selon certaines études, ce n'est pas tant la présence que l'absence d'étiquette sur la protéine qui impacterait la cristallogenèse mais plutôt la longueur ou la composition en acide aminé de cette étiquette (Bucher *et al.,* 2002; Smits *et al.,* 2008). Ainsi, Smits et ses collaborateurs ont montré que l'utilisation d'une étiquette comportant 5 résidus histidine ($His_5$) améliore sensiblement la cristallisation de l'octopine déshydrogénase de coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*) contrairement à une étiquette composée par 6 de ces mêmes résidus et que l'ajout de NADH (cofacteur de l'enzyme) permettait d'aboutir à la résolution de la

structure de la protéine (Smits *et al.,* 2008). La stratégie qui consiste à ajouter co-facteur(s) et/ou ligand(s) de la protéine peut également faciliter la formation de cristaux protéiques lors de l'étape de cristallogenèse. Pour ce faire, cette stabilisation peut être réalisée en amont de l'étape de purification de la protéine recombinante lors de l'étape de production en système hétérologue en ajoutant le ligand ou son précurseur directement dans le milieu de culture. Il est également possible d'intervenir en aval de l'étape de purification par une étape de saturation de la protéine purifiée par son ligand ou son cofacteur. Nous avons eu notamment recours à ces stratégies en ajoutant de l'acide 5-aminolévulinique qui est un précurseur de la voie de biosynthèse des hèmes lors de l'étape de production des GSTUs d'arabette nous permettant de purifier ces dernières complexées avec des tétrapyrroles (voir article 2). D'autres visent à optimiser le protocole d'obtention des cristaux ou la nature des cristaux obtenus par des méthodes de co-cristallisation et de trempage de cristaux (Hassell *et al.,* 2007; Müller 2017). La technique de co-cristallisation consiste à cristalliser la protéine en présence de son ligand (Hassell *et al.,* 2007; Smits *et al.,* 2008; Müller 2017). Elle présente l'avantage d'être utilisable sur des protéines s'agrégeant facilement et avec des ligands hydrophobes mais a l'inconvénient d'être coteuse en temps et en matériel. Elle est donc peu adaptée à la recherche à l'aveugle de ligands (Hassell *et al.,* 2007; Müller 2017). La méthode de trempage (« soaking » repose sur l'incubation d'un cristal protéique avec une solution (le plus souvent) concentrée en ligand. Cette méthode permet de minimiser la consommation en protéine et d'utiliser des ligands hydrophiles. Cette méthode ne peut cependant pas être utilisée sur tous les cristaux. Le cristal utilisé doit être suffisamment robuste et résistant pour supporter l'étape de trempage et donc la diffusion d'une concentration élevée en ligand au travers de ses canaux à solvant. Au niveau protéique, le site de fixation du ligand doit également rester accessible dans la forme cristalline cristallisée (Müller 2017). Les deux techniques telles que présentées ci-dessus nécessitent l'utilisation de solutions de ligand concentrées mais ces dernières peuvent également être réalisées « à sec ». Dans ce cas le ligand est préalablement solubilisé dans son solvant, puis mis à évaporer (Schwartz *et al.,* 2018). Après évaporation complète du ligand, la solution ou le cristal protéique sera ajouté(e). Cette technique a notamment permis de résoudre la structure tridimensionnelle d'une GST oméga 6S de *Trametes versicolor* complexée avec le flavonoïde naringénine (Schwartz *et al.,* 2018).

# Chapitre III : L'identification des ligands et substrats des GSTUs : la recherche du Saint Graal.

La recherche des substrats physiologiques des GSTs à serine constitue une étape supplémentaire primordiale pour la compréhension de leur(s) rôle(s) dans la cellule. Dans le cas des familles multigéniques, la génétique inverse peut être confrontée à l'existence d'une redondance entre gènes. Une approche alternative pour comprendre le rôle physiologique de ces protéines pourrait consister à identifier directement leurs substrats et ligands. Afin d'identifier les ligands/substrats physiologiques potentiels des GSTUs, plusieurs stratégies de capture *in vivo* et *in vitro* peuvent être envisagées. Quelques-unes de ces approches sont résumées en figure 19 et décrites ci-après.

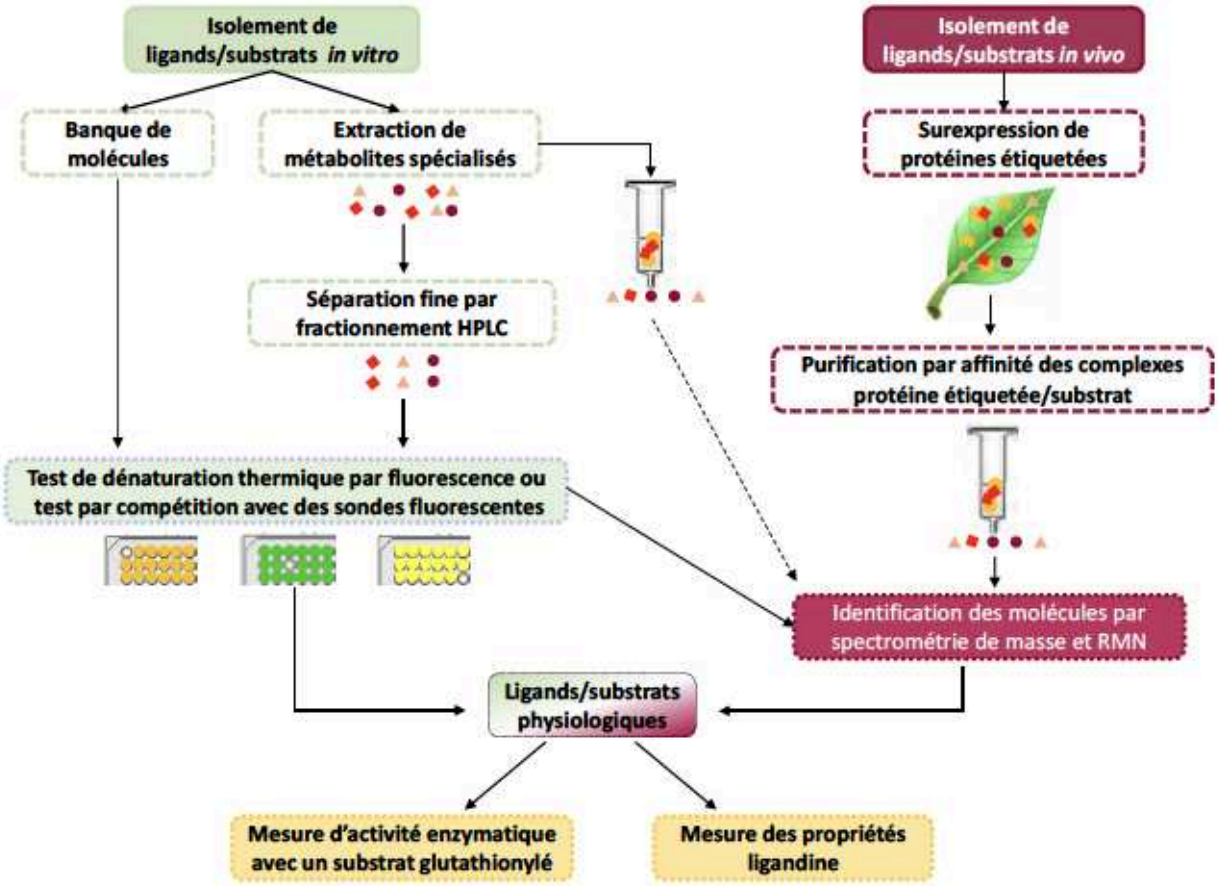



**Figure 19 : Les potentielles approches de capture et d'identification des ligands/substrats des GSTUs (Adaptée de Dixon *et al.*, 2010 ; Dixon et Edwards, 2018).**

L'approche par isolement de ligands *in vitro* est *a priori* la méthode la plus simple et la plus rapide à mettre en œuvre puisqu'elle permettra de tirer profit des protéines recombinantes qui ont été produites au cours de ma thèse. Ces dernières, après immobilisation sur une matrice, pourraient être exposées à des molécules issues d'une banque de molécules ou encore à des extraits bruts ou enrichis en métabolites spécialisés issus de tissus variés de peuplier et d'*A. thaliana*. Lors de la préparation de ces extraits, il sera probablement nécessaire de faire appel à différents procédés d'extraction (à chaud ou à froid) et à des méthodes chromatographiques de séparation haute performance (HPLC) qui sont disponibles au laboratoire. Une alternative à cette méthode pourrait consister en la réalisation de tests de compétition avec des sondes fluorescentes ou de tests de stabilité thermique comme déjà abordés au cours de cette thèse tout en se servant de molécules issues de banque de composés chimiques ainsi que des extraits de plante comme mentionné ci-dessus. Quant aux approches *in vivo*, ces dernières requièrent l'emploi de protéines étiquetées surproduites *in planta* notamment chez le tabac (*Nicotiana benthamiana*) qui est un bon modèle pour ce genre d'approche ou encore chez *A. thaliana*. Les protéines étiquetées et surexprimées *in vivo* auront un rôle de « piège à substrats » *in planta* et seront alors purifiées dans le meilleur des cas sous la forme de complexes enzyme-substrat ou enzyme-ligand par chromatographie d'affinité. Les molécules ainsi piégées seront alors identifiées par des méthodes de spectrométrie de masse éventuellement couplée à une séparation en phase liquide (ou gazeuse) et au besoin par résonance magnétique nucléaire. Cette approche, appelée « ligand fishing », a l'avantage d'être plus fiable et moins biaisée qu'une approche *in vitro* mais prendra certainement plus de temps dans sa réalisation. Il sera néanmoins nécessaire d'identifier les conditions d'extraction et de purification pour lesquelles le substrat (ou le ligand) sera fixé de façon optimale sur l'enzyme. Cette méthode a déjà été couronnée de succès puisqu'elle a notamment conduit à l'identification

d'acide chlorogénique et acide 12-oxo-phytodienoique pour la GST tau 19 d'arabette surexprimée chez le tabac (Dixon et Edwards 2009) ou encore plus récemment de divers flavonodes pour la GST phi 2 directement surexprimée chez *A. thaliana* (Dixon et Edwards 2018). Elle a également conduit à l'identification de quelques dérivés du flavonode kæmpferol comme ligands potentiels des GSTs lambda d'*A. thaliana* et de *Triticum aestivum* (Dixon et Edwards 2010b).
Dans notre cas il serait intéressant de piéger les GSTUs avec leur(s) ligand(s) à partir de plantes exprimant un variant étiqueté. Cette approche *in vivo* possède *a priori* l'avantage de cibler une GSTU en particulier. Nous avons obtenu les plasmides des 9 AtGSTUs avec une étiquette streptavidine. Ces plasmides ont été envoyés à nos collaborateurs de Montpellier (dans le cadre du projet ANR), les premières plantes ont été transformées avec succès. Les graines obtenues seront prochainement mises en culture.

Alors que les approches décrites ci-dessus ne permettent pas de discriminer le statut de ligand ou de substrat des métabolites interagissant avec les GSTUs, une méthode particulière de piégeage appelée identification bioorthogonale de substrats de GSTs ou BIGS (« bioorthogonal identification of GST substrates ») permettant de piéger sélectivement les substrats de ces enzymes est envisagée. Elle repose sur l'utilisation en lieu et place du traditionnel glutathion lors de réactions enzymatiques d'un glutathion fonctionnalisé par un groupement alcyne ou alcène au niveau de la glycine. A l'issue d'une réaction de conjugaison assurée par une GST d'intérêt, le produit glutathionylé issu de la réaction de conjugaison sera alors couplé à une molécule de biotine (biotine-azoture ou biotine-tétrazine) par chimie clic par l'intermédiaire de la glycine modifiée puis piégé par chromatographie d'affinité sur colonne saturée en avidine permettant ainsi son enrichissement (Figure 20).

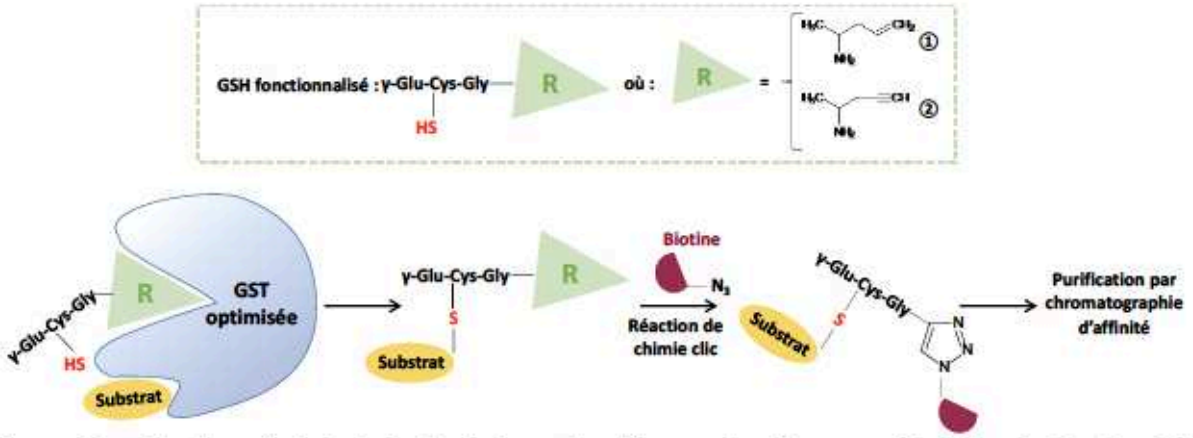



**Figure 20 : Principe général de la technique de piégeage *in vitro* par glutathion (γ-Glu-Cys-Gly) étiqueté (Modifiée de Feng *et al.*, 2014).**
Cette technique de piégeage de substrats, appelée identification bioorthogonale de substrats de GSTs ou BIGS (« bioorthogonal identification of GST substrates »), utilise un analogue de glutathion réduit comme co-substrat de la GST. La glycine du GSH est substituée par l'allyl-glycine (①) ou la propargyl-glycine (②).

Le choix d'une fonction alcène s'explique par le fait que le couplage par chimie clic entre la biotine-azoture et le glutathion-alcyne nécessite la présence de cuivre, alors que la réaction de couplage entre la biotine-tétrazine et le glutathion-alcène ne requiert aucun ion métallique (Figure 21).

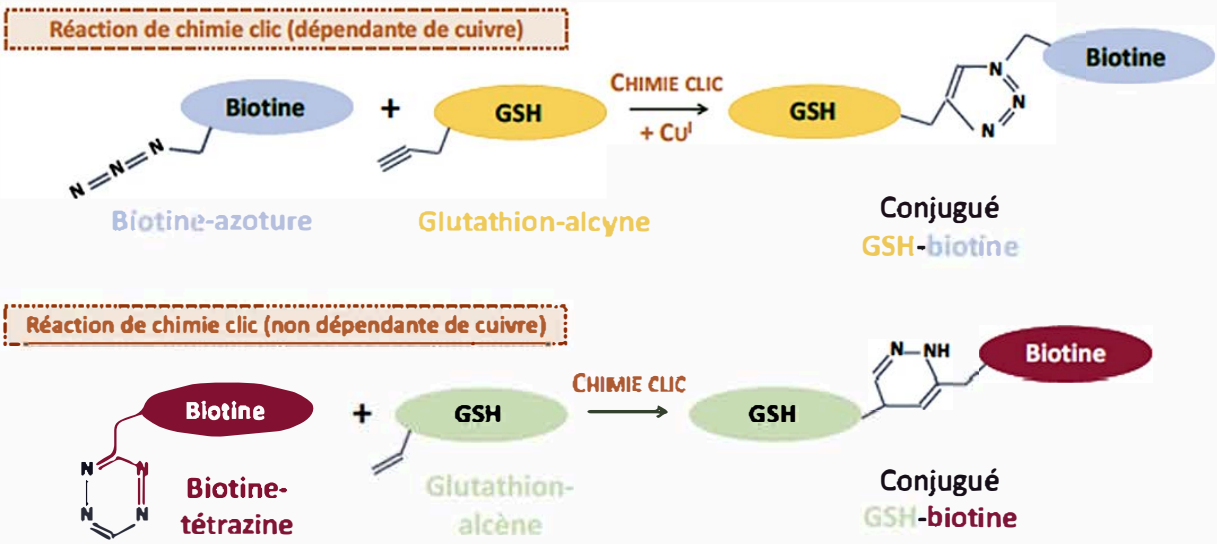



**Figure 21 : Principe général de la réaction de chimie clic.** La réaction de chimie clic permet de coupler une biomolécule d'intérêt à une autre molécule. La réaction dépendante de cuivre, dénommée réaction CuAAC (« Cu(I)-catalyzed Azide-Alkyne Click chemistry »), permet de coupler une fonction azoture à une fonction alcyne. La réaction clic non dépendante de cuivre (ou de tout autre ion métallique) est une méthode d'étiquetage non toxique, réalisée du fait de la haute réactivité de l'alcène pour la tétrazine.

Ce procédé, déjà employé lors de l'identification des molécules catalysées par la GSTM1 de *Schistosoma japonicum*, a conduit à identifier des substrats de cet enzyme au sein d'un mélange complexe d'herbes médicinales (Ganmaochongji), parmi lesquels sont notamment retrouvés le cyclodopa glucoside (un pigment végétal) et un dérivé de la 7-chloro-6-demethylcepharadione B (un alcaloïde) (Feng *et al.*, 2014). L'obtention de glutathion modifié est primordiale à la réalisation de cette méthode. Elle pourra être réalisée par synthèse chimique ou par voie enzymatique.

La synthèse chimique du tripeptide est réalisée en une dizaine d'étape consistant essentiellement en des réactions de protection et de déprotection des groupements fonctionnels des acides aminés composant le GSH (glutamate, cystéine et glycine). Les cycles de protection/déprotection reposent sur l'ajout de groupement protecteur, généralement fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc), permettant de bloquer les réactions parasites sur les groupes susceptibles de réagir puis à retirer ces derniers lors des étapes de déprotection (Feng *et al.*, 2014). Bien que cette méthode soit relativement simple à mettre en œuvre pour des chimistes aguerris, ce procédé nécessite de nombreuses étapes pouvant d'une part diminuer le rendement de formation du GSH et d'autre part être consommateur en temps. Une alternative à cette synthèse chimique pourrait consister à produire le glutathion modifié par voie enzymatique en deux étapes. Cette voie alternative nécessitera l'utilisation d'une glutamate-cystéine ligase qui assurera la condensation de cystéine et de glutamate pour former de la γ-L-glutamylcystéine qui sera ensuite couplée à la glycine par la glutathion synthétase pour former le glutathion. Des travaux récents ont montré qu'une version optimisée de cette dernière enzyme (mutant M4) est capable d'assurer la condensation de la γ-glutamyl-cystéine avec de la glycine modifiée (Samarasinghe *et al.*, 2014; 2016). Après avoir produit et purifié cette enzyme, j'ai réussi à obtenir les produits attendus (allyl-glutathion ou propargyl-glutathion). Je me suis ensuite assurée que ces dérivés du GSH étaient fonctionnels en effectuant des mesures d'activités de conjugaison du GSH contre du CDNB. Pour cela nous avons privilégié l'utilisation de variants de GSTF1 de peuplier pour lesquels le site catalytique a été plus ou moins optimisé pour accueillir du glutathion modifié. Suite à ces résultats préliminaires qui sont relativement prometteurs, d'autres essais seront rapidement réalisés avec les GSTUs

sauvages d'*Arabidopsis* et de peuplier. L'utilisation de la réaction clic étant nécessaire pour piéger les produits conjugués, sa mise au point sera initiée dès que possible.

L'une des problématiques récurrentes de l'approche *in vitro* à partir d'extraits est de réussir à extraire une quantité suffisante de métabolites spécialisés pour mener à bien l'étape d'identification des molécules piégées. Les méthodes consistant à enrichir les échantillons en métabolites permettent de contourner ce problème et peuvent nécessiter l'emploi de colonnes spécifiques de chromatographie d'affinité permettant un fractionnement différentiel. A titre d'exemple, certaines colonnes de chromatographie en phase inverse auront la capacité de retenir sélectivement des composés phénoliques hydrophobes. D'autres stratégies de chromatographie plus résolutives peuvent être employées telles que la HPLC quantitative ou la chromatographie flash. La chromatographie flash permet d'isoler des composés purs à partir d'un échantillon complexe. Elle est également plus rapide et moins coûteuse que la chromatographie liquide haute performance traditionnelle.
Quelle que soit la méthode sélectionnée pour enrichir les échantillons en complexes protéine-ligand/substrat, cette dernière devra être complétée par des approches de biologie structurale, de biophysique ou encore de biochimie, ceci dans le but de déterminer d'une part la nature exacte des molécules interagissant avec les GSTUs ainsi que leur statut (substrat ou ligand) et d'autre part de caractériser finement les complexes protéine-ligand ou substrat afin d'apporter des informations complémentaires sur la fonction des GSTUs. Les méthodes de biophysique telles que la titration calorimétrique isotherme (ITC), la résonance plasmonique de surface ou encore la technologie switchSENSE® peuvent être envisagées pour décrire plus finement les paramètres de l'interaction protéine-ligand (constante de dissociation ($K_D$), constantes cinétiques d'association et de dissociation ($k_{on}$, $k_{off}$)). La technologie switchSENSE® disponible sur la plateforme ASIA (Nancy) permet à la différence des autres méthodes précédemment citées de déterminer le diamètre hydrodynamique ($D_H$) du complexe protéine-ligand (Perrot *et al.,* 2018; Roret *et al.,* 2020). Une fois l'interaction identifiée, des méthodes de biochimie, telles que des analyses de compétition enzymatique contre les substrats CDNB ou PITC ou contre une sonde fluorescente dont le site de fixation (site G, H ou L) est connu, permettraient de définir avec précision le site de fixation du ligand/substrat. L'utilisation de sondes fluorescentes telles que la CMFDA (5-chlorométhylfluorescéine diacétate) qui se fixe au niveau du site G de l'enzyme ou l'ANS (acide 8-anilino-1-naphthalènesulfonique) se fixant au niveau du site H, est envisageable. Ces sondes ont déjà montré leur efficacité au laboratoire lors de travaux précédents réalisés sur des GSTs d'autres classes (Mathieu *et al.,* 2012; 2013; Lallement *et al.,* 2014b). La diminution d'activité de conjugaison de GSH de l'enzyme ou la variation de la fluorescence de la sonde reflèteront la capacité des substrats ou ligands à entrer en compétition avec le substrat modèle ou la sonde fluorescente. Cependant une absence d'inhibition de l'activité de l'enzyme ou de variation de fluorescence ne signifie pas forcément une absence d'interaction du ligand/substrat, elle pourrait indiquer que ce dernier se fixe en dehors du site de fixation. Dans ce cas, les techniques de biologie structurale semblent indispensables.
Quelques pistes, encore à l'état embryonnaire, ont déjà été abordées au cours de cette thèse. Dans un premier temps, nous nous sommes tournés vers les approches *in vitro* afin de tirer avantage des protéines recombinantes produites. Nous avons ensuite abordé ces approches en prenant en compte leur complexité croissante de mise en œuvre. Nous avons tout d'abord analysé les interactions des GSTUs avec des molécules issues d'une banque de molécules avant d'extraire des métabolites des organismes d'intérêt. Les premiers résultats de dénaturation thermique par fluorescence obtenus à partir d'une banque de molécules ciblées suggèrent une spécificité d'interaction entre certaines (furo)coumarines et les protéines AtGSTUs d'intérêt. Trente furocoumarines et vingt coumarines ont été testées. Bien qu'elles présentent toutes *a minima* le même noyau coumarine (figure 22), le comportement des GSTUs vis-à-vis de ces molécules varie du tout-au-tout.

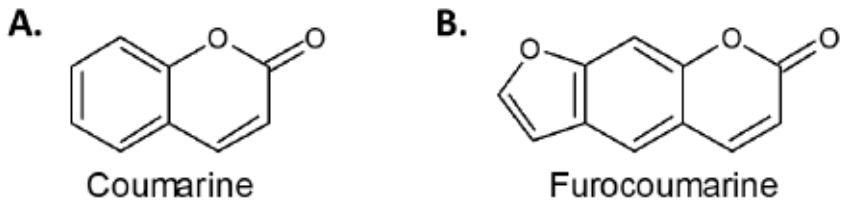



**Figure 22 : Structures des composés phénoliques employés lors de l'analyse de dénaturation thermique par fluorescence.**
Les furocoumarines sont composées d'un noyau coumarine additionné d'un cycle furane.

En effet, la liaison des (furo)coumarines par les GSTUs d'intérêt peut être répartie en fonction du clade d'appartenance de ces protéines. Ainsi les protéines du clade I interagissent en majorité avec les furocoumarines, alors que les enzymes du clade III lient essentiellement des coumarines. Le représentant du clade II (AtGSTU16), quant à lui, interagit à la fois avec les furocoumarines et les coumarines. Les furocoumarines présentant un encombrement stérique plus important que les coumarines, ces résultats suggèrent que la topologie du site de fixation diffère entre les protéines. La détermination du site précis de fixation de ces molécules (sites G, H ou L) permettra d'analyser les différences d'accessibilité au ligand. Les résultats d'interaction des protéines de peuplier avec des molécules cibles ayant été discutés dans l'article 3, ils ne seront pas rediscutés dans ce paragraphe. Bien que les résultats obtenus soient prometteurs quant à la nature des molécules interagissant avec les protéines GSTUs (composés phénoliques, terpènes, …), ces derniers sont potentiellement biaisés puisque ces molécules, issues d'une banque de composés chimiques, ne permettent pas de prendre en considération l'éventail des molécules interagissant réellement avec ces enzymes dans la plante. Une autre approche pourrait consister à se focaliser sur le métabolome d'*A. thaliana* et de *P. trichocarpa* et sélectionner les molécules les plus abondantes dans les compartiments o sont exprimés les GSTUs d'intérêt. Parmi ces métabolites devraient être présents des ligands des GSTs. Cependant bien qu'elle soit intéressante, cette approche a également le défaut de conserver un ***a priori*** sur les molécules à sélectionner. Afin de contourner ces biais, nous avons entrepris d'extraire tous les métabolites spécialisés d'*A. thaliana* et de *P. trichocarpa*.

Les GSTUs d'Arabidopsis d'intérêt étant majoritairement exprimées dans les racines (à l'exception de l'AtGSTU16 qui est exprimée dans les feuilles), nous avons extrait les métabolites provenant de ce même tissu. De plus, dans le but d'analyser l'implication potentielle des GSTUs d'*A. thaliana* dans le métabolisme racinaire des coumarines lors d'une carence en fer (dans le cadre du projet ANR MOBIFER), nous avons préparé des extraits de plantes sauvages (Col-0) ou de mutants *pdr9-2* (transporteur responsable de la sécrétion des coumarines au sein de la rhizosphère) cultivés en présence ou non de fer (Annexe figures A2 et A3). Les différents extraits obtenus ont par la suite été employés lors de tests préliminaires d'interaction (dénaturation thermique par fluorescence et test de compétition enzymatique par inhibition de l'activité GST) ou d'activité (test de conjugaison de GSH). Les résultats obtenus ont montré que, dans leur ensemble, les protéines AtGSTUs interagissent avec les molécules présentes dans les extraits racinaires et que ces dernières engendraient des déplacements thermiques majoritairement de type déstabilisateur. Ils ont de plus révélé que les extraits racinaires issus des plantes carencées en fer inhibaient l'activité de conjugaison de GSH des AtGSTU1 et AtGSTU6 contre le CDNB. Ce résultat confirme d'une part une interaction GSTUs-extraits racinaires et d'autre part que la molécule active dans cet extrait se lie à proximité du site actif de l'enzyme. Cependant nous n'avons pas détecté de conjugués glutathionylés suggérant une interaction n'entrainant pas de catalyse enzymatique.

La recherche des ligands/substrats des protéines GSTU19 et 20 de *P. trichocarpa* a été entreprise par la méthode de dénaturation thermique par fluorescence à partir de métabolites issus des feuilles, fruits, fleurs, bourgeons de peupliers mâle et femelle et obtenus par extraction à froid (méthanolique) et à chaud (divers solvants). Cette analyse a montré que les PtGSTU19 et 20 sont majoritairement déstabilisées par les molécules issues de bourgeons femelles extraites au dichlorométhane ou au méthanol. Des tests d'activité de conjugaison de GSH ont été initiés contre l'extrait méthanolique de bourgeon femelle pour les GSTU19 et 20 mais ces derniers devront être optimisés (activation de l'extrait) afin d'aboutir à une conclusion limpide.

# Chapitre IV : La place des GSTs de classe tau dans le règne du vivant

De leur présence quasi-exclusive aux plantes dites « supérieures », au nombre considérable d'isoformes présentes chez ces organismes en comparaison des GSTs d'autres classes (Lallement *et al.,* 2014a; Monticolo *et al.,* 2017; Sylvestre-Gonon *et al.,* 2019), les GSTUs pourraient représenter une classe singulière de GSTs. Ainsi l'analyse de différents résultats obtenus au cours de ce projet m'a conduit à me poser la question de la spécificité des GSTUs au sein du vivant.

## A. La classe des GSTs tau est-elle réellement spécifique des plantes ?

Bien que les GSTUs soient décrites comme prédominantes chez les plantes vasculaires, l'évolution des techniques de génomiques, de même que l'augmentation du nombre de génomes séquencés disponibles pourraient révéler que ces protéines ne sont pas limitées aux plantes. Différents paramètres suggérant la présence de GSTUs chez des organismes non photosynthétiques seront présentés dans ce paragraphe. Outre la caractérisation biochimique des GSTs de plantes, le laboratoire IAM, au sein duquel j'ai réalisé mes travaux de thèse, s'intéresse à la caractérisation des GSTs fongiques et plus particulièrement celles des champignons décomposeurs de bois dont fait partie *Trametes versicolor* (champignon de pourriture blanche). Ce dernier compte 44 gènes codant des GSTs dont 16 d'entre eux appartiennent à la classe oméga (Deroy *et al.,* 2015; thèse de Thomas Perrot, 2018). Bien que les GSTs de la classe oméga soient classiquement qualifiées de GSTs à cystéine conservée, seules 4 des 16 TvGSTOs possèdent ce résidu conservé (TvGSTOC), les 12 autres TvGSTOs contiennent un résidu sérine conservé au sein de leur site actif (TvGSTOS). Cette expansion de GSTs à sérine, caractéristique des GSTs tau et phi de plantes (Lallement *et al.,* 2014) ou epsilon et delta d'insectes (Hu *et al.,* 2020; Xu *et al.,* 2020), est retrouvée chez de nombreuses GSTOs de champignons (thèse de Thomas Perrot, 2018).

L'un des principaux facteurs utilisés pour classifier les GSTs est le pourcentage d'identité de séquence existant entre deux protéines. Pour rappel deux GSTs appartiennent à la même classe si elles partagent plus de 40% d'identité de séquence alors qu'elles appartiennent à des classes distinctes si elles partagent moins de 20% d'identité de séquence. Si le pourcentage d'identité de séquence est compris entre 20 et 40%, différents paramètres (taille et position des introns et des exons, profil d'activité enzymatique) entrent en considération pour inférer que ces protéines appartiennent à la même classe (Jacquot *et al.,* 2013). Le pourcentage d'identité de séquences entre les TvGSTOSs et les AtGSTUs est similaire à celui des TvGSTOSs et de la TvGSTO3C (autour de 20-25%), alors que ce pourcentage est plus élevé entre les TvGSTOSs et les autres TvGSTOCs. Cependant la comparaison des pourcentages d'identité de séquences de protéines d'une même classe montre que celui-ci peut diminuer entre espèces ; ainsi les pourcentages d'identité de séquence mesurés entre les GSTTs de plantes et celles d'animaux peuvent décroitre jusqu'à 15-20 %. Ce critère n'étant pas suffisant pour justifier la présence de GSTUs chez *Trametes versicolor*, une

comparaison des structures des gènes des TvGSTOSs et des GSTUs a été initiée. Les gènes codant les GSTOs à sérine et cystéine de *Trametes versicolor* contiennent 5 exons (à l'exception de TvGSTO5S qui est composée de 4 exons) proches des 6 exons composant les gènes codant les GSTOs de mammifères (Whitbread *et al.,* 2005). Les gènes codant les GSTUs sont formés quant à eux de 2 exons en moyenne (Lan *et al.,* 2009; Liu *et al.,* 2013; He *et al.,* 2016; Islam *et al.,* 2017; Sylvestre-Gonon *et al.,* 2019). Ainsi la distribution génomique des TvGSTOSs est à rapprocher de celle des autres GSTOs. La comparaison des TvGSTOSs et des GSTUs s'est poursuivie selon des critères biochimiques et structuraux. D'une part, parmi les nombreuses classes de GSTs étudiées au laboratoire et dont les protéines (GSTO, DHAR, GSTL, GSTU, métaxine) ont été purifiées par chromatographie d'affinité (étiquette polyhistidine), à ma connaissance, une modification de la coloration de la résine Ni-NTA suggérant la liaison de cofacteurs hémiques n'a été observée que pour quelques isoformes de GSTUs et 2 GSTOSs (TvGSTO2S et TvGSTO5S) (voir partie Résultats article n° 2). Bien qu'aucune étude n'ait été réalisée sur les TvGSTOSs présentant cette coloration, ces résultats suggèrent que ces protéines partagent cette caractéristique avec les GSTUs. D'autre part, la comparaison des motifs catalytiques des GSTUs et des TvGSTOSs révèle que ceux-ci sont similaires (Figure 23), conférant à ces protéines les mêmes capacités enzymatiques de conjugaison de glutathion et de réduction de peroxydes contre des substrats modèles. Les paramètres cinétiques mesurés pour les TvGSTOSs (Deroy *et al.,* non publié) sont du même ordre que ceux calculés pour les AtGSTUs et PtGSTUs d'intérêt (voir Tableau 3 partie Résultats). Ainsi l'efficacité catalytique des TvGSTOSs et des At et PtGSTUs d'intérêt contre le CDNB est comprise entre 100 et 30000 $M^{-1}.s^{-1}$ et ces enzymes possèdent une efficacité catalytique contre les isothiocyanates meilleure que celle mesurée avec tous les autres substrats.

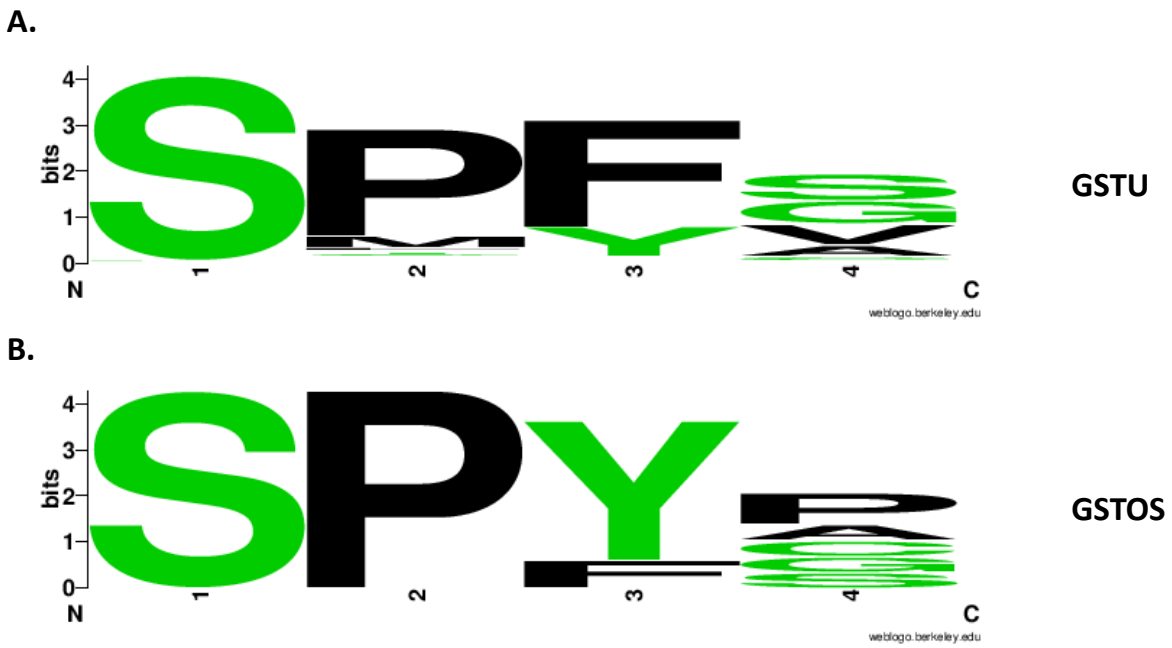



**Figure 23 : Comparaison des motifs catalytiques des GSTUs de plantes (A) et des GSTOs à sérine d'un champignon dégradeur de bois *(Trametes versicolor)*.**
L'alignement de 212 séquences des GSTUs de 33 organismes photosynthétiques (A) et des 6 séquences de TvGSTO à sérine (B) a été réalisé à l'aide du logiciel PROMALS 3D, puis manuellement ajusté au moyen du logiciel Seaview. Les logos représentant la fréquence d'apparition des résidus constituant le motif catalytique des enzymes ont été créés en ligne (https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi).

D'un point de vue structural, les GSTOs et GSTUs sont analogues (Thom *et al.,* 2002), d'ailleurs l'interface de dimérisation de GSTUs est plus proche de celle des GSTOs que de celles de membres de toute autre classe de GSTs (Axarli *et al.,* 2010). De plus, les TvGSTOSs sont structuralement plus proches des GSTUs que des GSTOs d'autres espèces (Homme, insecte,…) (thèse de Mathieu Schwartz, 2018). Cette ressemblance structurale pourrait expliquer la prise en charge de substrats communs entre les TvGSTOSs et les GSTUs étudiées au cours de ma thèse. En effet les études de dénaturation thermique par fluorescence réalisées à partir des banques de molécules disponibles au laboratoire ont mis en exergue que les TvGSTOSs et les GSTUs d'intérêt peuvent lier des composés phénoliques de diverses natures (Thomas Perrot, communication personnelle ; thèse de Thomas Perrot, 2018).
Bien qu'aucune preuve tangible ne soit apportée ici, tous les éléments mentionnés dans ce paragraphe permettent d'émettre l'hypothèse que les GSTOs à sérine de *Trametes versicolor* pourraient en réalité être des GSTUs. Ainsi la classe tau ne serait pas spécifique aux plantes mais serait partagée entre plantes et champignons. Cette découverte tardive de nouvelle classe de GSTs chez des organismes ne serait pas sans rappeler celle des GSTFs au sein des champignons, des bactéries et des protistes (Morel *et al.,* 2013; Munyampundu *et al.,* 2016). Cependant cette hypothèse doit être nuancée. Il pourrait en effet s'agir d'une convergence évolutive entre GSTUs et GSTOSs. Une étude phylogénétique plus approfondie, c'est-à-dire incluant des membres des classes de GSTs de champignons et de plantes, devra être réalisée afin de trancher sur une éventuelle relation entre GSTUs et GSTOSs. Cependant du fait de la variabilité importante au sein de cette famille de protéines, ce genre d'analyse sera probablement complexe à réaliser.

## B. Une redondance fonctionnelle intra - et interclasses ?

Les génomes d'*A. thaliana* et de *P. trichocarpa* comprennent respectivement 55 et 81 gènes codant des GSTs, dont 28 et 54 codent respectivement des GSTUs (Wagner *et al.,* 2002; Lan *et al.,* 2009). Cette expansion de la classe tau traduit l'existence de nombreux évènements de duplication au sein des génomes végétaux. Ces évènements auraient pu aboutir à la formation de pseudogènes au cours de l'évolution, cependant on observe que ces différents gènes codent des protéines fonctionnelles. Au vu de la nature parcimonieuse de la cellule, il est toujours judicieux de s'interroger sur l'intérêt qu'a la cellule à conserver autant de représentants d'une même classe/famille.

Une explication pourrait être la diversification. En effet les nombreux membres de GSTs de classe tau pourraient présenter des divergences structurales, biochimiques et/ou fonctionnelles permettant la prise en charge spécifique de composés de nature variée et justifiant ainsi la conservation d'autant d'isoformes. L'étude que nous avons menée, bien que réalisée sur un nombre limité d'isoformes, a révélé des spécificités enzymatiques entre les GSTUs d'*A. thaliana* et entre celles de peuplier. L'analyse de l'activité de conjugaison de GSH de PtGSTUs contre le 4-HNE démontre bien, l'intérêt qu'a cet organisme à conserver plusieurs isoformes de GSTUs. Ainsi, d'après notre étude, la protéine PtGSTU27 serait plus à même de contrecarrer les effets délétères engendrés par la peroxydation des lipides alors que la protéine PtGSTU30, qui possède la meilleure efficacité catalytique contre le CDNB, pourrait détoxiquer des xénobiotiques. Ces résultats sont en faveur d'une implication des GSTUs dans le mécanisme de détoxication. Bien que l'implication des GSTUs dans la détoxication des herbicides et des phytoprotecteurs ne soit plus à démontrer (Anderson et Davis 2004; Benekos *et al.,* 2010; Li *et al.,* 2017), l'apparition de ces molécules est postérieure à celle des GSTUs. Quoique l'évolution ait détourné la fonction des GSTUs pour répondre à la menace des herbicides, cette fonction ne semble pas être le rôle majeur des GSTUs.
Un des rôles potentiels de ces enzymes pourrait être un rôle de défense systématique. En effet de nombreux gènes codant des GSTUs sont surexprimés lors de stress biotiques et abiotiques alors qu'en condition normale, ceux-ci sont exprimés de façon constitutive (Sharma *et al.,* 2004; Skopelitou *et al.,*

2015; Kao *et al.,* 2016). A l'instar des protéines de choc thermique HSP (« heat shock protein ») les GSTUs pourraient être des protéines chaperons produites en réponse à différents stress. Ce rôle de chaperon est d'autant plus valable que les GSTUs, comme de nombreuses autres GSTs possèdent une propriété ligandine permettant le transport/stockage de molécules (Alfenito 1998; Ahmad *et al.,* 2017).

Au travers des nombreuses discussions intra-équipe, une observation récurrente a émergé. Bien que les GSTs interagissent avec de nombreuses molécules, à l'exception des activités mesurées à partir de substrats modèles, un nombre limité de ces interactants sont catalytiquement transformés par les GSTs. Ces observations pourraient s'expliquer par le fait que, le rôle physiologique principal des GSTUs impliquerait en priorité leur fonction ligandine et leurs activités catalytiques n'auraient qu'un rôle secondaire ou accessoire, l'absence d'activité pourrait être corrélée à un état d'oxydation inapproprié des interactants. Pour rappel, au sein du xénome, les GSTs n'interviennent qu'après que les xénobiotiques aient été activés par oxydation par l'intermédiaire des enzymes de phase I. Lorsque ces molécules ne sont pas activées, ce sont majoritairement des propriétés ligandines qui sont détectées (Thomas Perrot, Eric Gelhaye, discussions personnelles). Cette observation pourrait expliquer le fait qu'aucune activité de conjugaison n'ait été décelée pour la GSTU1 de maïs (*Zea mays*) contre les dérivés protoporphyrines (Lederer et Böger 2003; 2005) alors qu'une activité de conjugaison de GSH contre ces tétrapyrroles ait été observée pour ce même enzyme quelques années après (Dixon *et al.,* 2008). En effet, Dixon et ses collaborateurs ont utilisé la porphyrine sous sa forme réduite activée alors que Lederer et Böger l'ont employée sous sa forme non activée. Des tests comparatifs (avec ou sans activation préalable) seront entrepris pour vérifier cette observation.

Bien que quelques GSTUs d'*A. thaliana* et de *P. trichocarpa* présentent des particularités biochimiques, la grande majorité de ces protéines sont fonctionnellement redondantes.
Au-delà des redondances existant au sein de la classe des GSTUs d'un organisme, nous avons également vu que ces enzymes partagent de nombreuses similarités structurales et/ou biochimiques avec des GSTs d'autres classes (Phi et Omega principalement). Mais est-ce bien étonnant que les GSTs possèdent de nombreuses similitudes ? Tout bien considéré, ces enzymes appartiennent à la même famille protéique.

En conclusion, la singularité apparente des GSTUs semble n'être que superficielle. Cependant, au vu des connaissances actuelles, il reste difficile de répondre à la question de la place et de l'utilité des GSTUs au sein des plantes. L'identification des substrats physiologiques reste primordiale afin de déterminer la fonction de ces protéines et ainsi déterminer l'intérêt pour la cellule à conserver toutes ces isoformes.

# Références bibliographiques

# *Références bibliographiques*

# *A*

Achilonu I., Thendo P.S. et Heini W.D. 2014. « Purification and Characterisation of Recombinant Human Eukaryotic Elongation Factor 1 Gamma ». *Protein Expression and Purification* 99 (juillet): 70-77. https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.04.003.

Adamis P. D. B., Gomes D. S., Pinto M. L. C. C., Panek A. D. et Eleutherio E. C. A. 2004. « The Role of Glutathione Transferases in Cadmium Stress ». Toxicology Letters 154 (1-2): 81-88. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.07.003.

Agianian B., Tucker P. A., Schouten A., Leonard K., Bullard B. et Gros P. 2003. « Structure of a Drosophila Sigma Class Glutathione S-Transferase Reveals a Novel Active Site Topography Suited for Lipid Peroxidation Products ». *Journal of Molecular Biology* 326 (1): 151-65. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01327-X.

Ahmad L., Rylott E. L., Bruce N. C., Edwards R. et Grogan G. 2017. « Structural Evidence for Arabidopsis Glutathione Transferase At GSTF2 Functioning as a Transporter of Small Organic Ligands ». *FEBS Open Bio* 7 (2): 122-32. https://doi.org/10.1002/2211-5463.12168.

Al Khamici H., Brown L. J., Hossain K. R., Hudson A. L., Sinclair-Burton A. A., Ng J. P. M., Daniel E. L., Hare J. E., Cornell B. A., Davey M. W. et Valenzuela S. M. 2015. « Members of the Chloride Intracellular Ion Channel Protein Family Demonstrate Glutaredoxin-Like Enzymatic Activity ». PLoS ONE 10 (1): e115699. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115699.

Alam N.B. et Ghosh A. 2018. « Comprehensive Analysis and Transcript Profiling of *Arabidopsis Thaliana* and *Oryza Sativa* Catalase Gene Family Suggests Their Specific Roles in Development and Stress Responses ». *Plant Physiology and Biochemistry* 123 (février): 54-64. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.018.

Alberty R. A. et Hammes G. G. 1958. « Application of the Theory of Diffusion-Controlled Reactions to Enzyme Kinetics ». *The Journal of Physical Chemistry* 62 (2): 154-59. https://doi.org/10.1021/j150560a005.

Alcalde M. 2007. « Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications ». In *Industrial Enzymes* 461-76. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_26.

Alfenito M. R., Souer E., Goodman C. D., Buell R., Mol J., Koes R. et Walbot V. 1998. « Functional Complementation of Anthocyanin Sequestration in the Vacuole by Widely Divergent Glutathione S-Transferases ». *The Plant Cell* 10 (7): 1135-50. https://doi.org/10.1105/tpc.10.7.1135.

Alias Z. et Clark A. G. 2007. « Studies on the Glutathione S-Transferase Proteome of Adult Drosophila Melanogaster: Responsiveness to Chemical Challenge ». *PROTEOMICS* 7 (19): 3618-28. https://doi.org/10.1002/pmic.200700070.

Allocati N., Casalone E., Masulli M., Polekhina G., Rossjohn J., Parker M. W. et Di Ilio C. 2000. « Evaluation of the role of two conserved active-site residues in Beta class glutathione S-transferases ». *Biochemical Journal* 351 (2): 341-46.

Allocati N., Federici L., Masulli M. et Di Ilio C. 2009. « Glutathione Transferases in Bacteria: Bacterial GSTs ». *FEBS Journal* 276 (1): 58-75. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743.x.

Allocati N., Federici L., Masulli M. et Di Ilio C. 2009. « Glutathione Transferases in Bacteria: Bacterial GSTs ». *FEBS Journal* 276 (1): 58-75. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743.x.

Ameen N., Amjad M., Murtaza B., Abbas G., Shahid M., Imran M., Naeem M. A. et Niazi N. K. 2019. « Biogeochemical Behavior of Nickel under Different Abiotic Stresses: Toxicity and Detoxification Mechanisms in Plants ». *Environmental Science and Pollution Research* 26 (11): 10496-514. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04540-4.

Andersen Ø. M. 2001. « Anthocyanins ». In *Encyclopedia of Life Sciences.* https://doi.org/10.1038/npg.els.0001909.

Andersen Ø. M. et Jordheim M. 2010. « Anthocyanins ». In *Encyclopedia of Life Sciences*. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001909.pub2.

Anderson J. V. et Davis D. G. 2004. « Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in Euphorbia esula ». *Physiologia plantarum* 120 (3): 421-33.

Anjum N. A., Sharma P., Gill S. S., Hasanuzzaman M., Khan E. A., Kachhap K., Mohamed A. A., et al. 2016. « Catalase and Ascorbate Peroxidase—Representative H2O2-Detoxifying Heme Enzymes in Plants ». *Environmental Science and Pollution Research* 23 (19): 19002-29. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6.

Aravindan V., Muthukumaravel S. et Gunasekaran K. 2014. « Interaction affinity of Delta and Epsilon class glutathione-s-transferases (GSTs) to bind with DDT for detoxification and conferring resistance in Anopheles gambiae, a malaria vector ». *Journal of vector borne diseases* 51 (1): 8.

Arca P., Rico M., Brana A. F., Villar C. J., Hardisson C. et Suarez J. E. 1988. « Formation of an adduct between fosfomycin and glutathione: a new mechanism of antibiotic resistance in bacteria. » *Antimicrobial agents and chemotherapy* 32 (10): 1552-56.

Argenzio E. et Moolenaar W. H. 2016. « Emerging Biological Roles of $Cl^-$ Intracellular Channel Proteins ». *Journal of Cell Science* 129 (22): 4165-74. https://doi.org/10.1242/jcs.189795.

Arregui L., Ayala M., Gómez-Gil X., Gutiérrez-Soto G., Hernández-Luna C. E., Herrera de los Santos, Laura Levin, et al. 2019. « Laccases: Structure, Function, and Potential Application in Water Bioremediation ». *Microbial Cell Factories* 18 (1): 200. https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0.

Awasthi Y. C., Ansari G. A. S. et Awasthi S. 2005. « Regulation of 4-Hydroxynonenal Mediated Signaling By Glutathione S-Transferases ». In *Methods in Enzymology*, 401:379-407. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01024-4.

Axarli I., Dhavala P., Papageorgiou A. C. et Labrou N. E. 2009. « Crystallographic and Functional Characterization of the Fluorodifen-Inducible Glutathione Transferase from Glycine Max Reveals an Active Site Topography Suited for Diphenylether Herbicides and a Novel L-Site ». *Journal of Molecular Biology* 385 (3): 984-1002. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.084.

Axarli I., Georgiadou C., Dhavala P., Papageorgiou A. C. et Labrou N. E. 2010. « Investigation of the Role of Conserved Residues Ser13, Asn48 and Pro49 in the Catalytic Mechanism of the Tau Class Glutathione Transferase from Glycine Max ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804 (4): 662-67. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.016.

# *B*

Bak S., Beisson F., Bishop G., Hamberger B., Höfer R., Paquette S. et Werck-Reichhart D. 2011. « Cytochromes P450 ». *The Arabidopsis Book* 9 (janvier): e0144. https://doi.org/10.1199/tab.0144.

Bartley K., Wright H. W., Bull R. S., Huntley J. F. et Nisbet A. J. 2015. « Characterisation of Dermanyssus Gallinae Glutathione S-Transferases and Their Potential as Acaricide Detoxification Proteins ». *Parasites & Vectors* 8 (1): 350. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0960-9.

Bašica B., Mihaljević I., Maraković N., Kovačević R. et Smital T. 2019. « Molecular Characterization of Zebrafish Gstr1, the Only Member of Teleost-Specific Glutathione S- Transferase Class ». *Aquatic Toxicology* 208 (mars): 196-207. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.005.

Bathe U. et Tissier A. 2019. « Cytochrome P450 Enzymes: A Driving Force of Plant Diterpene Diversity ». *Phytochemistry* 161 (mai): 149-62. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.12.003.

Belchik S. M. et Xun L. 2011. « S-Glutathionyl-(Chloro)Hydroquinone Reductases: A New Class of Glutathione Transferases Functioning as Oxidoreductases ». *Drug Metabolism Reviews* 43 (2): 307-16. https://doi.org/10.3109/03602532.2011.552909.

Benekos K., Kissoudis C., Nianiou-Obeidat I., Labrou N., Madesis P., Kalamaki M., Makris A. et Tsaftaris A. 2010. « Overexpression of a Specific Soybean GmGSTU4 Isoenzyme Improves Diphenyl Ether and Chloroacetanilide Herbicide Tolerance of Transgenic Tobacco Plants ». *Journal of Biotechnology* 150 (1): 195-201. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.011.

Birnboim H. C. et Doly J. 1979. « A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA ». *Nucleic Acids Research* 7 (6): 1513-23. https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513.

Board P. G. 2011. « The Omega-Class Glutathione Transferases: Structure, Function, and Genetics ». *Drug Metabolism Reviews* 43 (2): 226-35. https://doi.org/10.3109/03602532.2011.561353.

Board P. G. et Anders M. W. 2007. « Glutathione Transferase Omega 1 Catalyzes the Reduction of S-(Phenacyl)Glutathiones to Acetophenones ». *Chemical Research in Toxicology* 20 (1): 149-54. https://doi.org/10.1021/tx600305y.

Board P. G., Coggan M., Cappello J., Zhou H., Oakley A. J. et Anders M. W. 2008. Â« S-(4-Nitrophenacyl)Glutathione Is a Specific Substrate for Glutathione Transferase Omega 1-1 ». *Analytical Biochemistry* 374 (1): 25-30. https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.09.029.

Board P. G., Coggan M., Chelvanayagam G., Easteal S., Jermiin L. S., Schulte G. K., Danley D. E., et al. 2000. « Identification, Characterization, and Crystal Structure of the Omega Class Glutathione Transferases ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (32): 24798-806. https://doi.org/10.1074/jbc.M001706200.

Bock K. W. 2016. « The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily Expressed in Humans, Insects and Plants: Animal: Plant Arms-Race and Co-Evolution ». *Biochemical Pharmacology* 99 (janvier): 11-17. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.001.

Booth J., Boyland E. et Sims P. 1961. « An Enzyme from Rat Liver Catalysing Conjugations with Glutathione ». *The Biochemical Journal* 79 (3): 516-24.

Boschi-Muller S., Olry A., Antoine M. et Branlant G. 2005. « The Enzymology and Biochemistry of Methionine Sulfoxide Reductases *». Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics* 1703 (2): 231-38. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.09.016.

Boscolo Papo M., Maccatrozzo L., Bertotto D., Pascoli F., Negrato E., Poltronieri C., Binato G., Gallina A. et Radaelli G. 2014. « Expression of CYP4 and GSTr Genes in Venerupis Philippinarum Exposed to Benzo(a)Pyrene ». *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 196 (4): 241-46. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2013.11.003.

Bourbonnais R., Paice M. G. , Reid , Lanthier P. et Yaguchi M. 1995. « Lignin oxidation by laccase isozymes from Trametes versicolor and role of the mediator 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. » *Applied and Environmental Microbiology* 61 (5): 1876-80.

Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier E., Kellner S. et Matern U. 2006. « Biosynthesis of Coumarins in Plants: A Major Pathway Still to Be Unravelled for Cytochrome P450 Enzymes ». *Phytochemistry Reviews* 5 (2-3): 293-308. https://doi.org/10.1007/s11101-006-9040-2.

Brazier-Hicks M., Gershater M., Dixon D. et Edwards R. 2018. « Substrate Specificity and Safener Inducibility of the Plant UDP-Glucose-Dependent Family 1 Glycosyltransferase Super-Family ». *Plant Biotechnology Journal* 16 (1): 337-48. https://doi.org/10.1111/pbi.12775.

Bresell A., Weinander R., Lundqvist G., Raza H., Shimoji M., Sun T.-H., Balk L., et al. 2005. « Bioinformatic and Enzymatic Characterization of the MAPEG Superfamily: Characterization of MAPEG Members ». *FEBS Journal* 272 (7): 1688-1703. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04596.x.

Brock J., Board P. G. et Oakley A. J. 2013. « Structural Insights into Omega-Class Glutathione Transferases: A Snapshot of Enzyme Reduction and Identification of a Non-Catalytic Ligandin Site ». Édité par Bostjan Kobe. *PLoS ONE* 8 (4): e60324. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060324.

Brumbarova T., Bauer P. et Ivanov R. 2015. « Molecular Mechanisms Governing Arabidopsis Iron Uptake ». *Trends in Plant Science* 20 (2): 124-33. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.004.

Bucher M. H., Evdokimov A. G. et Waugh D. S. 2002. « Differential Effects of Short Affinity Tags on the Crystallization of Pyrococcus Furiosus Maltodextrin-Binding Protein ». *Acta Crystallographica Section D* 58 (3): 392-97. https://doi.org/10.1107/S0907444901021187.

Bunderson B. R., Kim J. E., Croasdell A., Mendoza K. M., Reed K. M. et Coulombe R. A. 2013. « Hetero logous Expression and Functional Characterization of Avian Mu-Class Glutathione S-Transferases ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 158 (2): 109-16. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.05.007.

# *C*

Caccuri A. M., Antonini G., Allocati N., Di Ilio C., De Maria F., Innocenti F., Parker M. W., 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 ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (21): 18777-84. https://doi.org/10.1074/jbc.M201137200.

Cai M. et Xun L. 2002. « Organization and regulation of pentachlorophenol-degrading genes in in Sphingobium chlorophenolicum ATCC 39723 ». *Journal of bacteriology* 184 (17): 4672-80.

Calabrese, Gaetano, Bruce Morgan, et Jan Riemer. 2017. « Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions ». *Antioxidants & Redox Signaling* 27 (15): 1162-77. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7121.

Calmes B., Morel-Rouhier M., Bataillé-Simoneau N., Gelhaye E., Guillemette T. Simoneau P. 2015. « Characterization of Glutathione Transferases Involved in the Pathogenicity of Alternaria Brassicicola ». *BMC Microbiology* 15 (1): 123. https:// doi.org/10.1186/s12866-015-0462-0.

Caputi L., Malnoy M., Goremykin V., Nikiforova S. et Martens S. 2012. « A Genome-Wide Phylogene tic Reconstruction of Family 1 UDP-Glycosyltransferases Revealed the Expansion of the Family during the Adaptation of Plants to Life on Land: Phylogeny Reconstruction of Plant Family 1 UGTs ». *The Plant Journal* 69 (6): 1030-42. https:// doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04853.x.

Carberry S., Neville C. M., Kavanagh K. A. et Doyle S. 2006. « Analysis of Major Intracellular Proteins of Aspergillus Fumigatus by MALDI Mass Spectrometry: Identification and Characterisation of an Elongation Factor 1B Protein with Glutathione Transferase Activity ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341 (4): 1096-1104. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.078.

Carletti E., Sulpizio M., Bucciarelli T., Del Boccio P., Federici L. et Di Ilio C. 2008. « Glutathione Transferases from Anguilla Anguilla Liver: Identification, Cloning and Functional Characterization ». *Aquatic Toxicology* 90 (1): 48-57. https:// doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.015.

Carson M., Johnson D. H., McDonald H., Brouillette C. et DeLucas L. J. 2007. « His-Tag Impact on Structure ». *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 63 (3): 295-301. https://doi.org/10.1107/S0907444906052024.

Cazarolli L., Zanatta L., Alberton E., Santos Bonorino Figueiredo M., Folador P., Damazio R., Pizzolatti M. et Silva F. R. B. 2008. « Flavonoids: Prospective Drug Candidates ». *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8 (13): 1429-40. https:// doi.org/10.2174/138955708786369564.

Černý M., Habánová H., Berka M., Luklová M. et Brzobohatý B. 2018. « Hydrogen Peroxide: Its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (9): 2812. https://doi.org/10.3390/ ijms19092812.

Chan W., Chien Y. et Chien C. 2015. « Aniline Exposure Associated with Up-Regulated Transcrip tional Responses of Three Glutathione S-Transferase Delta Genes in Drosophila Melanogaster ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 39 (2): 622-27. https:// doi.org/10.1016/j.etap.2014.12.023.

Chatterjee A. et Gupta S. 2018. « The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Cancer ». *Cancer Letters* 433 (octobre): 33-42. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.028.

Chen J., Gao L., Baek D., Liu C., Ruan Y. et Shi H. 2015. « Detoxification Function of the *Arabidop sis* Sulphotransferase AtSOT12 by Sulphonation of Xenobiotics: Detoxification Function of AtSOT12 ». *Plant, Cell & Environment* 38 (8): 1673-82. https://doi.org/10.1111/ pce.12525.

Chen L., Wu H., Zhao J., Zhang W., Zhang L., Sun S., Yang D., Cheng B. et Wang Q. 2018. « The Role of GST Omega in Metabolism and Detoxification of Arsenic in Clam Ruditapes Philippinarum ». *Aquatic Toxicology* 204 (novembre): 9-18. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.08.016.

Chew O., Whelan J. et Millar A. H. 2003. « Molecular Definition of the Ascorbate-Glutathione Cycle in *Arabidopsis* Mitochondria Reveals Dual Targeting of Antioxidant Defenses in Plants ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 46869-77. https://doi.org/10.1074/jbc.M307525200.

Choi H.-J., Cha S. J. et Kim K. 2019. « Glutathione Transferase Modulates Acute Ethanol-Induced Sedation in *Drosophila* Neurones: Acute Ethanol-Induced Sedation in *Drosophila* Neurones ». *Insect Molecular Biology* 28 (2): 246-52. https://doi.org/10.1111/imb.12547.

Choi J. H., Lou W. et Vancura A. 1998. « A Novel Membrane-Bound Glutathione *S*-Transferase Functions in the Stationary Phase of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (45): 29915-22. https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29915.

Chronopoulou E., Madesis P., Asimakopoulou B., Platis D., Tsaftaris A. et Labrou N. E. 2012. « Catalytic and Structural Diversity of the Fluazifop-Inducible Glutathione Transferases from Phaseolus Vulgaris ». *Planta* 235 (6): 1253-69. https://doi.org/10.1007/s00425-011-1572-z.

Chronopoulou E., Madesis P., Tsaftaris A. et Labrou N. E. 2014. « Cloning and Characterization of a Biotic-Stress-Inducible Glutathione Transferase from Phaseolus Vulgaris ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172 (2): 595-609. https://doi.org/10.1007/s12010-013-0509-3.

Chrysostomou C., Quandt E. M., Marshall N. M., Stone E. et Georgiou. G. 2015. « An Alternate Pathway of Arsenate Resistance in *E. Coli* Mediated by the Glutathione S-Transferase GstB ». *ACS Chemical Biology* 10 (3): 875-82. https://doi.org/10.1021/cb500755j.

Clarke H., Egan D. A., Heffernan M., Doyle S., Byrne C., Kilty C. et Ryan M. P. 1997. « α-glutathione s-transferase (α-GST) release, an early indicator of carbon tetrachloride hepatotoxicity in the rat ». *Human & experimental toxicology* 16 (3): 154-57.

Coleman J., Blake-Kalff M. et Davies E. 1997. « Detoxification of Xenobiotics by Plants: Chemical Modification and Vacuolar Compartmentation ». *Trends in Plant Science* 2 (4): 144-51. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01019-4.

Combes B. et Stakelum G. S. 1961. « A Liver Enzyme That Conjugates Sulfobromophtalein Sodium with Glutathione ». *Journal of Clinical Investigation* 40 (6): 981-88. https://doi.org/10.1172/JCI104337.

Conn S., Curtin C., Bézier A., Franco C. et Zhang W. 2008. « Purification, Molecular Cloning, and Characterization of Glutathione S-Transferases (GSTs) from Pigmented Vitis Vinifera L. Cell Suspension Cultures as Putative Anthocyanin Transport Proteins ». *Journal of Experimental Botany* 59 (13): 3621-34. https://doi.org/10.1093/jxb/ern217.

Cummins I., O'Hagan D., Jablonkai I., Cole D. J., Hehn A., Werck-Reichhart D. et Edwards R. 2003. « Cloning, Characterization and Regulation of a Family of Phi Class Glutathione Transferases from Wheat ». *Plant Molecular Biology* 52 (3): 591-603.

# D

Davis C., Carberry S., Schrettl M., Singh I.,Stephens J. C., Sarah M. Barry, Kavanagh K., Challis G. L., Brougham D. et Doyle S. 2011. « The Role of Glutathione S-Transferase GliG in Gliotoxin Biosynthesis in Aspergillus Fumigatus ». *Chemistry & Biology* 18 (4): 542-52. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.12.022.

Delage L., Leblanc C., Collén P. N., Gschloessl B., Oudot M.-P., Sterck L., Poulain J., Aury J.-M. et Cock . M. 2011. « In Silico Survey of the Mitochondrial Protein Uptake and Maturation Systems in the Brown Alga Ectocarpus Siliculosus ». Édité par Edward Newbigin. *PLoS ONE* 6 (5): e19540. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019540.

Demmig-Adams B. 1990. « Carotenoids and Photoprotection in Plants: A Role for the Xanthophyll Zeaxanthin ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1020 (1): 1-24. https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90088-L.

del Río L. A., Sandalio L. M., Corpas F. J., Palma J. M. et Juan B. Barroso. 2006. « Reactive Oxygen « Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling ». *Plant Physiology* 141 (2): 330-35. https://doi.org/10.1104/pp.106.078204.

Denton H., McGregor J. C. et Coombs G. H. 2004. « Reduction of Anti-Leishmanial Pentavalent Antimonial Drugs by a Parasite-Specific Thiol-Dependent Reductase, TDR1 ». *Biochemical Journal* 381 (2): 405-12. https://doi.org/10.1042/BJ20040283.

Deponte M. 2013. « Glutathione Catalysis and the Reaction Mechanisms of Glutathione-Dependent Enzymes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (5): 3217-66. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018.

Deponte M. 2017. « The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures? » *Antioxidants & Redox Signaling* 27 (15): 1130-61. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7123.

Deroy A., Saiag F., Kebbi-Benkeder Z., Touahri N., Hecker A., Morel-Rouhier M., Colin F., Dumarcay S., Gérardin P. et Gelhaye G. 2015. « The GSTome Reflects the Chemical Environment of White-Rot Fungi ». Édité par Kristiina Hildén. *PLOS ONE* 10 (10): e0137083. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137083.

Ding N., Wang A., Zhang X., Wu Y., Wang R., Cui H., Huang R. et Luo Y. 2017. « Identification and Analysis of Glutathione S-Transferase Gene Family in Sweet Potato Reveal Divergent GST-Mediated Networks in Aboveground and Underground Tissues in Response to Abiotic Stresses ». *BMC Plant Biology* 17 (1). https://doi.org/10.1186/s12870-017-1179-z.

Dixon D. P., Davis B. G. et Edwards R. 2002a. « Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants identification of two classes with putativefunctions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (34): 30859-69.

Dixon D. P. et Edwards R. 2009. « Selective Binding of Glutathione Conjugates of Fatty Acid Derivatives by Plant Glutathione Transferases ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (32): 21249-56. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.020107.

Dixon D. P. et Edwards R. 2010a. « Glutathione Transferases ». *The Arabidopsis Book* 8 : e0131. https://doi.org/10.1199/tab.0131.

Dixon D. P. et Edwards R. 2010b. « Roles for Stress-Inducible Lambda Glutathione Transferases in Flavonoid Metabolism in Plants as Identified by Ligand Fishing ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (47): 36322-29. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.164806.

Dixon D. P. et Edwards R. 2018. « Protein-Ligand Fishing in Planta for Biologically Active Natural Products Using Glutathione Transferases ». *Frontiers in Plant Science* 9: 1659. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01659.

Dixon D. P., Hawkins T., Hussey P. J. et Edwards R. 2009. « Enzyme Activities and Subcellular Localization of Members of the Arabidopsis Glutathione Transferase Superfamily ». *Journal of Experimental Botany* 60 (4): 1207-18. https://doi.org/10.1093/jxb/ern365.

Dixon D. P., Lapthorn A. et Edwards R. 2002b. « Plant Glutathione Transferases ». *Genome Biology* 3 (3): REVIEWS3004.

Dixon D. P., Lapthorn A., Madesis P., Mudd E. A., Day A. et Edwards R. 2008. « Binding and Glutathione Conjugation of Porphyrinogens by Plant Glutathione Transferases ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (29): 20268-76. https://doi.org/10.1074/jbc.M802026200.

Dixon D. P., Sellars J. D. et Edwards R. 2011a. « The *Arabidopsis* Phi Class Glutathione Transferase At GSTF2: Binding and Regulation by Biologically Active Heterocyclic Ligands ». *Biochemical Journal* 438 (1): 63-70. https://doi.org/10.1042/BJ20101884.

Dixon D. P., Skipsey M. et Edwards R. 2010. « Roles for Glutathione Transferases in Plant Secondary Metabolism ». *Phytochemistry* 71 (4): 338-50. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.12.012.

Dixon D. P., Steel P. G. et Edwards R. 2011b. « Roles for Glutathione Transferases in Antioxidant Recycling ». *Plant Signaling & Behavior* 6 (8): 1223-27. https://doi.org/10.4161/psb.6.8.16253.

Dowling D. J., Hamilton C. M., Donnelly S., La Course J., Brophy P. M., Dalton J., et O'Neill S. M. 2010. « Major Secretory Antigens of the Helminth Fasciola Hepatica Activate a Suppressive Dendritic Cell Phenotype That Attenuates Th17 Cells but Fails To Activate Th2 Immune Responses ». *Infection and Immunity* 78 (2): 793-801. https://doi.org/10.1128/IAI.00573-09.

Dugrand-Judek A., Olry A., Hehn A., Costantino G., Ollitrault P., Froelicher Y. et Bourgaud F. « The Distribution of Coumarins and Furanocoumarins in Citrus Species Closely Matches Citrus Phylogeny and Reflects the Organization of Biosynthetic Pathways ». *PLOS ONE* 10 (11): e0142757. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142757.

Durst F. et O'Keefe D. P. 1995. « Plant cytochromes P450: an overview ». *Drug metabolism and drug interactions* 12 (3-4): 171-88.

# *E*

Eigen M. et Hammes G. G. 1963. « Elementary steps in enzyme reactions (as studied by relaxation spectrometry). » *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry* 25: 1.

Elter A., Hartel A., Sieben C., Hertel B., Fischer-Schliebs E., Lüttge U., Moroni A. et Thiel G. 2007. « A Plant Homolog of Animal Chloride Intracellular Channels (CLICs) Generates an Ion Conductance in Heterologous Systems ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (12): 8786-92. https://doi.org/10.1074/jbc.M607241200.

# $\mathcal{F}$

Fan C., Zhang S., Liu Z., Li L., Luan J. et Saren G. 2007. « Identification and Expression of a Novel Class of Glutathione-S-Transferase from Amphioxus Branchiostoma Belcheri with Implications to the Origin of Vertebrate Liver ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2): 450-61. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.09.013.

Federici L., Masulli M., Gianni S., Di Ilio C. et Allocati N. 2009. « A Conserved Hydrogen-Bond Network Stabilizes the Structure of Beta Class Glutathione S-Transferases ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382 (3): 525-29. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.052.

Feng S., Zhang L., Adilijiang G., Liu J., Luo M. et Deng H. 2014. « Substrate Profiling of Glutathione S-Transferase with Engineered Enzymes and Matched Glutathione Analogues ». *Angewandte Chemie International Edition* 53 (28): 7149-53. https://doi.org/10.1002/anie.201402000.

Fillgrove K. L., Pakhomova S., Schaab M. R., Newcomer M. E. et Armstrong R. N. 2007. « Structure and Mechanism of the Genomically Encoded Fosfomycin Resistance Protein, FosX, from *Listeria Monocytogenes* [†,‡] ». *Biochemistry* 46 (27): 8110-20. https://doi.org/10.1021/bi700625p.

Firn R. D. et Jones C. G. 2009. « A Darwinian View of Metabolism: Molecular Properties Determine Fitness ». *Journal of Experimental Botany* 60 (3): 719-26. https://doi.org/10.1093/jxb/erp002.

Fourcroy P., Sisó-Terraza P., Sudre D., Savirón M., Reyt G., Gaymard F., Abadía A., Abadia J., Álvarez-Fernández A. et Briat J.-F. 2014. « Involvement of the ABCG37 Transporter in Secretion of Scopoletin and Derivatives by *Arabidopsis* Roots in Response to Iron Deficiency ». *New Phytologist* 201 (1): 155-67. https://doi.org/10.1111/nph.12471.

Fourcroy P., Tissot N., Gaymard F., Briat J.-F., et Dubos C. 2016. « Facilitated Fe Nutrition by Phenolic Compounds Excreted by the Arabidopsis ABCG37/PDR9 Transporter Requires the IRT1/FRO2 High-Affinity Root Fe 2+ Transport System ». *Molecular Plant* 9 (3): 485-88. https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.010.

Foyer C. H. et Noctor G. 2011. « Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub ». *Plant Physiology* 155 (1): 2-18. https://doi.org/10.1104/pp.110.167569.

Frear D. S. et Swanson H. R. 1970. « Biosynthesis of S-(4-Ethylamino-6-Isopropylamino- 2-s-Triazino) Glutathione: Partial Purification and Properties of a Glutathione S-Transferase from Corn ». *Phytochemistry* 9 (10): 2123-32. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85377-7.

Frova C. 2006. « Glutathione Transferases in the Genomics Era: New Insights and Perspectives ». *Biomolecular Engineering* 23 (4): 149-69. https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.05.020.

Fyfe P. K., Westrop G. D., Silva A. M., Coombs G. H. et Hunter W. N. 2012. « Leishmania TDR1 Structure, a Unique Trimeric Glutathione Transferase Capable of Deglutathionylation and Antimonial Prodrug Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (29): 11693-98. https://doi.org/10.1073/pnas.1202593109.

# G

Garcerá A., Barreto L., Piedrafita L., Tamarit J. et Herrero E. 2006. « *Saccharomyces Cerevisiae* Cells Have Three Omega Class Glutathione S-Transferases Acting as 1-Cys Thiol Transferases ». *Biochemical Journal* 398 (2): 187-96. https://doi.org/10.1042/BJ20060034.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D. 2003. « Espèces réactives de l'oxygène ». *L'actualité chimique*, 91.

Gill S. S., Anjum N. A., Gill R., Yadav S., Hasanuzzaman M., Fujita M., Mishra P., Sabat S. C. et Tuteja N. 2015. « Superoxide Dismutase—Mentor of Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants ». *Environmental Science and Pollution Research* 22 (14): 10375-94. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4532-5.

Glawischnig E. 2007. « Camalexin ». Phytochemistry 68 (4): 401-6. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.12.005.

Gomez C., Conejero G., Torregrosa L., Cheynier V., Terrier N. et Ageorges A. 2011. « In Vivo Grapevine Anthocyanin Transport Involves Vesicle-Mediated Trafficking and the Contribution of AnthoMATE Transporters and GST: Anthocyanin Trafficking in Grapevine ». *The Plant Journal* 67 (6): 960-70. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04648.x.

Gonzalez D., Fraichard S., Grassein P., Delarue P., Senet P., Nicolaï P., Chavanne E., et al. 2018. « Characterization of a Drosophila Glutathione Transferase Involved in Isothiocyanate Detoxification ». *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 95 (avril): 33-43. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.03.004.

Gu Y., Zhao J., Ao L., Ma J., Bao K., Liu M. et Huang W. 2018. « The Influence of Polymorphic GSTM1 Gene on the Increased Susceptibility of Non-Viral Hepatic Cirrhosis: Evidence from Observational Studies ». *European Journal of Medical Research* 23 (1): 34. https://doi.org/10.1186/s40001-018-0331-z.

Gururaja Rao S., Ponnalagu D., Sukur S., Singh H., Sanghvi S., Mei Y., Jin D. J. et Harpreet Singh. 2017. « Identification and Characterization of a Bacterial Homolog of Chloride Intracellular Channel (CLIC) Protein ». *Scientific Reports* 7 (1): 8500. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08742-z.

# H

Harris J. M., Meyer D. J., Coles B. et Ketterer B. 1991. « A Novel Glutathione Transferase (13–13) Isolate from the Matrix of Rat Liver Mitochondria Having Structural Similarity to Class Theta Enzymes ». *Biochemical Journal* 278 (1): 137-41. https://doi.org/10.1042/bj2780137.

Harrop S. J., DeMaere M. Z., Fairlie W. D., Reztsova T., Valenzuela S. M., Mazzanti M., Tonini R., Qiu M. R., Jankova L. et Warton K. 2001. « Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (48): 44993-0.

Hasanuzzaman M., Nahar K., Anee T. I. et Fujita M. 2017. « Glutathione in Plants: Biosynthesis and Physiological Role in Environmental Stress Tolerance ». *Physiology and Molecular Biology of Plants* 23 (2): 249-68. https://doi.org/10.1007/s12298-017-0422-2.

Hassell A. M., An G., Bledsoe R. K., Bynum J. M., Carter H. L., Deng S.-J. J., Gampe R. T., et al. 2007. « Crystallization of protein–ligand complexes ». *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 63 (1): 72-79. https://doi.org/10.1107/S0907444906047020.

Haubruge É. et Amichot M. 1998. « Les mécanismes responsables de la résistance aux insecti cides chez les insectes et les acariens ». *BASE*.

Havaux M. 2014. « Carotenoid Oxidation Products as Stress Signals in Plants ». *The Plant Journal* 79 (4): 597-606. https://doi.org/10.1111/tpj.12386

Hayes J. D., Flanagan J. U. et Jowsey I. R. 2005. « GLUTATHIONE TRANSFERASES ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45 (1): 51-88. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.

Hayes J. D. et Pulford D. J. 1995. « The GlutAthione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Lsoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30 (6): 445-520. https://doi.org/10.3109/10409239509083491.

He G., Guan C.-N., Chen Q.-X., Gou X.-J., Liu W., Zeng Q.-Y. et Lan T. 2016. « Genome-Wide Analysis of the Glutathione S-Transferase Gene Family in Capsella rubella: Identification, Expression, and Biochemical Functions ». *Frontiers in Plant Science* 7 (août). https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01325.

Hendry G. 1986. « WHY DO PLANTS HAVE CYTOCHROME P-450? DETOXIFICATION VERSUS DEFENCE ». *New Phytologist* 102 (2): 239-47. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1986.tb00578.x.

Henry L. K., Thomas S. T., Widhalm J. R., Lynch J. H., Davis T. C., Kessler S. A., Bohlmann J., Noel J. P. et Dudareva N. 2018. « Contribution of Isopentenyl Phosphate to Plant Terpenoid Metabolism ». *Nature Plants* 4 (9): 721-29. https://doi.org/10.1038/s41477-018-0220-z.

Hiratsuka A., Hirose K., Saito H. et Watabe T. 2000. « 4-Hydroxy-2 (E)-nonenal enantiomers:(S)-selective inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and detoxification by rat glutathione S-transferase A4-4 ». *Biochemical Journal* 349 (3): 729-35.

Hirsch E. B., Raux B. R., Zucchi P. C., Kim Y., McCoy C., Kirby J. E., Wright S. B. et Eliopoulos G. M. 2015. « Activity of Fosfomycin and Comparison of Several Susceptibility Testing Methods against Contemporary Urine Isolates ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 46 (6): 642-47. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.08.012.

Hu B., Zhao J., Lai B., Qin Y., Wang H. et Hu G. 2016. « LcGST4 Is an Anthocyanin-Related Gluta thione S-Transferase Gene in Litchi Chinensis Sonn. » *Plant Cell Reports* 35 (4): 831-43. https://doi.org/10.1007/s00299-015-1924-4.

Hu C., Wang W., Ju D., Chen G.-M., Tan X.-L., Mota-Sanchez D. et Yang X.-Q. 2020. « Functional Characterization of a Novel Λ-cyhalothrin Metabolizing Glutathione *S* -transferase, CpGSTe3, from the Codling Moth *Cydia Pomonella* ». *Pest Management Science* 76 (3): 1039-47. https://doi.org/10.1002/ps.5614.

Hu X., Benson P. J., Srivastava S. K., Xia H., Bleicher R. J., Zaren H. A., Awasthi S., Awasthi Y. C. et Singh S. V. 1997. « Induction of glutathione S-transferase π as a bioassay for the evaluation of potency of inhibitors of benzo (a) pyrene-induced cancer in a murine model ». *International journal of cancer* 73 (6): 897-902.

Huang M. T., Lu Y. C., Zhang S., Luo F. et Yang H. 2016. « Rice ( *Oryza Sativa* ) Laccases Involved in Modification and Detoxification of Herbicides Atrazine and Isoproturon Residues in Plants ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (33): 6397-6406. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02187.

Huang Y., Xun R. , Chen G. et Xun L. 2008. « Maintenance Role of a Glutathionyl-Hydroquinone Lyase (PcpF) in Pentachlorophenol Degradation by Sphingobium Chlorophenolicum ATCC 39723 ». *Journal of Bacteriology* 190 (23): 7595-7600. https://doi.org/10.1128/JB.00489-08.

Huber C., Bartha B. et Schröder P. 2012. « Metabolism of Diclofenac in Plants – Hydroxylation Is Followed by Glucose Conjugation ». *Journal of Hazardous Materials* 243 (décembre): 250-56. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.023.

# *I*

Islam S., Rahman I. A., Islam T. et Ghosh A. 2017. « Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Glutathione S-Transferase Gene Family in Tomato: Gaining an Insight to Their Physiological and Stress-Specific Roles ». Édité par Debasis Chakrabarty. *PLOS ONE* 12 (11): e0187504. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187504.

# *J*

Jacquot J.-P., Dietz K. J. , Rouhier N., Meux E., Lallement P.-A., Selles B., et Hecker A. 2013. « Redox Regulation in Plants: Glutathione and “Redoxin” Related Families ». In *Oxidative Stress and Redox Regulation*, édité par Ursula Jakob et Dana Reichmann, 213-31. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5787-5_8.

Jakobsson P.-J., Morgenstern R., Mancini J., Ford-Hutchinson A. et Persson B. 2000. Â« Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG) a widespread protein superfamily ». *American journal of respiratory and critical care medicine* 161 (supplement_1): S20-24.

Jan S. et Abbas N. 2018. « Chemistry of Himalayan Phytochemicals ». In *Himalayan Phytoche micals*, 121-66. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102227-6.00004-8.

Janusz G., Pawlik A., Świderska-Burek U., Polak J., Sulej J., Jarosz-Wilkołazka A. et Paszczyński A. 2020. « Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (3): 966. https://doi.org/10.3390/ijms21030966.

Jeppesen M. G., Ortiz P., Shepard W., Kinzy T. G., Nyborg J. et Andersen G. R. 2003. « The Crystal Structure of the Glutathione *S* -Transferase-like Domain of Elongation Factor 1Bγ from *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 47190-98. https://doi.org/10.1074/jbc.M306630200.

Jimenez A., Hernandez J. A., del Río L. A. et Sevilla F. 1997. « Evidence for the presence of the ascorbate glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves ». *Plant physiology* 114 (1): 275-84.

Johansson A.-S. et Mannervik B. 2002. « Active-Site Residues Governing High Steroid Isomerase Activity in Human Glutathione Transferase A3-3 ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (19): 16648-54. https://doi.org/10.1074/jbc.M201062200.

Jowsey I. R., Thomson A. M., Flanagan J. U., Murdock P. R., Moore G. B. T., Meyer D. J., Murphy G. J., Smith S. A. et Hayes J. D. 2001. « Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases ». *Biochemical Journal* 359 (3): 507-16.

Jowsey I. R., Thomson R. E., Orton T. C., Elcombe C. R. et Hayes J. D. 2003. « Biochemical and Genetic Characterization of a Murine Class Kappa Glutathione S-Transferase ». *Biochemical Journal* 373 (2): 559-69. https://doi.org/10.1042/bj20030415.

# *K*

Kammerscheit X., Chauvat F. et Cassier-Chauvat C. 2019. « From Cyanobacteria to Human, MAPEG-Type Glutathione-S-Transferases Operate in Cell Tolerance to Heat, Cold, and Lipid Peroxidation ». *Frontiers in Microbiology* 10 (septembre): 2248. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02248.

Kao C.-W., Bakshi M., Sherameti I., Dong S., Reichelt M., Oelmüller R. et Yeh K.-W. 2016. « A Chinese Cabbage (Brassica Campetris Subsp. Chinensis) τ-Type Glutathione-S-Transferase Stimulates Arabidopsis Development and Primes against Abiotic and Biotic Stress ». *Plant Molecular Biology* 92 (6): 643-59. https://doi.org/10.1007/s11103-016-0531-2.

Kärkönen A. et Kuchitsu K. 2015. « Reactive Oxygen Species in Cell Wall Metabolism and Develop ment in Plants ». *Phytochemistry* 112 (avril): 22-32. https:// doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.016.

Kaur G., Gupta S. K., Singh P., Ali V., Kumar V. et Verma M. 2020. « Drug-Metabolizing Enzymes: Role in Drug Resistance in Cancer ». *Clinical and Translational Oncology* 22 (10): 1667-80. https://doi.org/10.1007/s12094-020-02325-7.

Keppler D. 1999. « Export Pumps for Glutathione S-Conjugates ». *Free Radical Biology & Medicine* 27 (9-10): 985-91.

Ketterer B., Christodoulides L., Enderby G. et Tipping E. 1974. « Mercapturic Acid Biosynthesis: The Separate Identities of Glutathione-S-Aryl Chloride Transferase and Ligandin ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 57 (1): 142-47. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(74)80368-2.

Khedia J., Agarwal P. et Agarwal P. K. 2019. « Deciphering Hydrogen Peroxide-Induced Signalling towards Stress Tolerance in Plants ». *3 Biotech* 9 (11): 395. https:// doi.org/10.1007/s13205-019-1924-0.

Kim J., Suh H., Kim S., Kim K., Ahn C. et « 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 ». *Biochemical Journal* 398 (3): 451-60. https://doi.org/10.1042/BJ20060424.

Kim Y.-S., Park S.-I., Kim J.-J., Boyd J. S., Beld J., Taton A., Lee K.-I., Kim I.-S., Golden J. W. et Yoon H.-S. 2020. « Expression of Heterologous OsDHAR Gene Improves Glutathione (GSH)-Dependent Antioxidant System and Maintenance of Cellular Redox Status in Synechococcus elongatus PCC 7942 ». *Frontiers in Plant Science* 11 (mars): 231. https://doi.org/10.3389/ fpls.2020.00231.

Kitamura S., Akita Y., Ishizaka H., Narumi I. et Tanaka A. 2012. « Molecular Characterization of an Anthocyanin-Related Glutathione S-Transferase Gene in Cyclamen ». *Journal of Plant Physiology* 169 (6): 636-42. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.12.011.

Kitamura S., Shikazono N. et Tanaka A. 2004. « TRANSPARENT TESTA 19 Is Involved in the Accumulation of Both Anthocyanins and Proanthocyanidins in Arabidopsis ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 37 (1): 104-14.

Klontz E.H., Tomich A. D., Günther S., Lemkul J. A., Deredge D., Silverstein Z., JoAnna F. Shaw J. F., et al. 2017. « Structure and Dynamics of FosA-Mediated Fosfomycin Resistance in Klebsiella Pneumoniae and Escherichia Coli ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (11): e01572-17, e01572-17. https://doi.org/10.1128/AAC.01572-17.

Koenig S. H. et Brown R. D. 1972. « H2CO3 as Substrate for Carbonic Anhydrase in the Dehydration of HCO3- ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69 (9): 2422-25. https://doi.org/10.1073/pnas.69.9.2422.

Kontur W. S., Bingman C. A., Olmsted C. N., Wassarman D. R., Ulbrich A., Gall D. L., Smith R. W., et al. 2018. « *Novosphingobium Aromaticivorans* Uses a Nu-Class Glutathione *S* -Transferase as a Glutathione Lyase in Breaking the β-Aryl Ether Bond of Lignin ». *Journal of Biological Chemistry* 293 (14): 4955-68. https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001268.

Koonin E. V., Tatusov R. L., Altschul S. F., Bryant S. H., Mushegian A. R., Bork P. et Valencia A. 1994. « Eukaryotic translation elongation factor 1γ contains a glutathione transferase domain—Study of a diverse, ancient protein super family using motif search and structural modeling ». *Protein Science* 3 (11): 2045-55.

Kraus P. 1980. « Resolution, Purification and Some Properties of Three Glutathione Transferases from Rat Liver Mitochondria ». *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 361 (1): 9-15.

Kreuz K., Tommasini R. et Martinoia E. 1996. « Old Enzymes for a New Job (Herbicide Detoxification in Plants) ». *Plant Physiology* 111 (2): 349-53. https://doi.org/10.1104/pp.111.2.349.

Kruk J., Holländer-Czytko H., Oettmeier W. et Trebst A. 2005. « Tocopherol as Singlet Oxygen Scaven ger in Photosystem II ». *Journal of Plant Physiology* 162 (7): 749-57. https:// doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.020.

# *L*

Labrou N. E., Papageorgiou A. C., Ourania Pavli O. et Flemetakis E. 2015. « Plant GSTome: Structure and Functional Role in Xenome Network and Plant Stress Response ». *Current Opinion in Biotechnology* 32 (avril): 186-94. https:// doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.024.

Ladner J. E., Parsons J. F., Rife C. L., Gilliland G. L. et Armstrong R. N. 2004. « Parallel Evolutionary Pathways for Glutathione Transferases: Structure and Mechanism of the Mitochondrial Class Kappa Enzyme RGSTK1-1 † ». *Biochemistry* 43 (2): 352-61. https:// doi.org/10.1021/bi035832z.

Lallement P.-A., Roret T., Tsan P., Gualberto J. M., Girardet J.-M., Didierjean C., Rouhier N. et Hecker A. 2016. « Insights into Ascorbate Regeneration in Plants: Investigating the Redox and Structural Properties of Dehydroascorbate Reductases from *Populus trichocarpa* ». *Biochemical Journal* 473 (6): 717-31. https://doi.org/10.1042/BJ20151147.

Lallement P.-A., Brouwer B., Keech O., Hecker A., et Rouhier N. 2014a. « The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants ». *Frontiers in Pharmacology* 5. https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00192.

Lallement P.-A., Meux E., Gualberto J. M., Dumarcay S., Favier F., Didierjean C., Saul F., et al. 2015. « Glutathionyl-Hydroquinone Reductases from Poplar Are Plastidial Proteins That Deglutathionylate Both Reduced and Oxidized Glutathionylated Quinones ». *FEBS Letters* 589 (1): 37-44. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.021.

Lallement P.-A., Meux E., Gualberto J. M., Prosper P., Didierjean C., Saul F., Haouz A., Rouhier N. et Hecker A. 2014b. « Structural and Enzymatic Insights into Lambda Glutathione Transferases from *Populus Trichocarpa* , Monomeric Enzymes Constituting an Early Divergent Class Specific to Terrestrial Plants ». *Biochemical Journal* 462 (1): 39-52. https://doi.org/10.1042/BJ20140390.

Lam L. K. M., Zhang Z., Board P. G. et Xun L. 2012. « Reduction of Benzoquinones to Hydro quinones via Spontaneous Reaction with Glutathione and Enzymatic Reaction by *S* - Glutathionyl-Hydroquinone Reductases ». *Biochemistry* 51 (25): 5014-21. https://doi.org/10.1021/bi300477z.

Lamoureux G. L., Shimabukuro R. H. et Frear D. S. 1991. « Glutathione and glucoside conjugation in herbicide selectivity ». *Herbicide resistance in weeds and crops*, 227-61.

Lamoureux G. L., Shimabukuro R. H., Swanson H. R. et Frear D. S. 1970. « Metabolism of 2-Chloro-4-Ethylamino-6-Isopropylamino-s-Triazine (Atrazine) in Excised Sorghum Leaf Sections ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18 (1): 81-86. https://doi.org/10.1021/jf60167a029.

Lan P., Li W., Wen T.-N., Shiau J.-Y., Wu Y.-C., Lin W. et Schmidt W. 2011. « ITRAQ Protein Profile Analysis of Arabidopsis Roots Reveals New Aspects Critical for Iron Homeostasis ». *PLANT PHYSIOLOGY* 155 (2): 821-34. https://doi.org/10.1104/pp.110.169508.

Lan T., Yang Z.-L., Yang X., Liu Y.-J., Wang X.-R. et Zeng Q.-Y. 2009. « Extensive Functional Diversification of the Populus Glutathione S-Transferase Supergene Family ». *The Plant Cell* 21 (12): 3749-66. https://doi.org/10.1105/tpc.109.070219.

Larkin R. M. 2016. « Tetrapyrrole Signaling in Plants ». *Frontiers in Plant Science* 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01586.

Larsen E. S., Alfenito M. R., Briggs W. R. et Walbot V. 2003. « A Carnation Anthocyanin Mutant Is Complemented by the Glutathione S-Transferases Encoded by Maize Bz2 and Petunia An9 ». *Plant Cell Reports* 21 (9): 900-904. https://doi.org/10.1007/s00299-002-0545-x.

Lederer B. et Böger P. 2003. « Binding and Protection of Porphyrins by Glutathione S-Transferases of Zea Mays L. » *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1621 (2): 226-33. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00073-4.

Lederer B. et Böger P. 2005. « A Ligand Function of Glutathione S-Transferase ». *Zeitschrift Fur Natur forschung. C, Journal of Biosciences* 60 (3-4): 166-71.

Lerksuthirat T. et Ketterman A. J. 2008. « Characterization of Putative Hydrophobic Substrate Binding Site Residues of a Delta Class Glutathione Transferase from Anopheles Dirus ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 479 (1): 97-103. https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.08.006.

Levi A. J. et Arias I. M. 1969. « Two Hepatic Cytoplasmic Protein Fractions, Y and Z, and Their Possible Role in the Hepatic Uptake of Bilirubin, Sulfobromophthalein, and Other Anions ». *Journal of Clinical Investigation* 48 (11): 2156-67. https://doi.org/10.1172/JCI106182.

Lewis A. D., Hayes J. D. et Wolf C. R. 1988. « Glutathione and Glutathione-Dependent Enzymes in Ovarian Adenocarcinoma Cell Lines Derived from a Patient before and after the Onset of Drug Resistance: Intrinsic Differences and Cell Cycle Effects ». *Carcinogenesis* 9 (7): 1283-87. https://doi.org/10.1093/carcin/9.7.1283.

Li D.-F., Feng L., Hou Y.-J. et Liu W. 2013. « The expression, purification and crystallization of a ubiqui tin-conjugating enzyme E2 from Agrocybe aegerita underscore the impact of His-tag location on recombinant protein properties ». *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 69 (Pt 2): 153-57. https://doi.org/10.1107/S1744309112051755.

Li D., Xu L., Pang S., Liu Z., Zhao W. et Wang C. 2017. « Multiple Pesticides Detoxification Function of Maize ( *Zea Mays* ) *GST34* ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (9): 1847-53. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00057.

Li G., Shen D., Liang X.-F., He Y. et He S. 2013. « Effects of Malachite Green on the MRNA Expression of Detoxification-Related Genes in Nile Tilapia ( *Oreochromis Niloticus* ) and Other Major Chinese Freshwater Fishes ». *Environmental Toxicology* 28 (3): 137-45. https://doi.org/10.1002/tox.20706.

Li L., Yuan H., Zeng Y. et Xu Q. 2016. « Plastids and Carotenoid Accumulation ». In *Carotenoids in Nature*, 79:273-93. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_10.

Liang C., Ju W., Pei S., Tang Y. et Xiao Y. 2017. « Pharmacological Activities and Synthesis of Esculetin and Its Derivatives: A Mini-Review ». *Molecules* 22 (3): 387. https://doi.org/10.3390/molecules22030387.

Liao C.-Y., Zhang K., Niu J.-Z., Ding T.-B., Zhong R., Xia W.-K., Dou W. et Wang J.-J. 2013. « Identification and Characterization of Seven Glutathione S-Transferase Genes from Citrus Red Mite, Panonychus Citri (McGregor) ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (12): 24255-70. https://doi.org/10.3390/ijms141224255.

Lieberherr D., Wagner U., Dubuis P.-H., Métraux J.-P. et Mauch F. 2003. « The Rapid Induction of Glutathione S-Transferases AtGSTF2 and AtGSTF6 by Avirulent Pseudomonas Syringae Is the Result of Combined Salicylic Acid and Ethylene Signaling ». *Plant & Cell Physiology* 44 (7): 750-57.

Lightfoot D. J., Mcgrann G. R. D. et Able A. J. 2017. « The Role of a Cytosolic Superoxide Dismutase in Barley-Pathogen Interactions: HvCSD1 Role in Barley-Pathogen Interactions ». *Molecular Plant Pathology* 18 (3): 323-35. https://doi.org/10.1111/mpp.12399.

Lin J.-H., Tu S.-H., Chen L.-C., Huang C.-C., Chang H.-L., Cheng T.-C., Chang H.-W., Wu C.-H., Wu H.-C. Ho Y.-S. 2018. « Oestrogen Receptor-Regulated Glutathione S-Transferase Mu 3 Expression Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Cytotoxicity, Which Confers Tamoxifen Resistance on Breast Cancer Cells ». *Breast Cancer Research and Treatment* 172 (1): 45-59. https://doi.org/10.1007/s10549-018-4897-5.

Lindström H., Peer S. M., Ing N. H. et Mannervik B. 2018. « Characterization of Equine GST A3-3 as a Steroid Isomerase ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 178 (avril): 117-26. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.11.011.

Lister R., Carrie C., Duncan O., Ho L. H. M., Howell K. A., Murcha M. W. et Whelan J. 2007. « Functional Definition of Outer Membrane Proteins Involved in Preprotein Import into Mitochondria ». *The Plant Cell* 19 (11): 3739-59. https://doi.org/10.1105/tpc.107.050534.

Littler D. R., Brown L. J., Breit S. N., Perrakis A. et Curmi P. M. G. 2010. « Structure of Human CLIC3 at 2 Å Resolution ». *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, NA-NA. https://doi.org/10.1002/prot.22675.

Littler D. R., Harrop S. J., Brown L. J., Pankhurst G. J., Mynott A. V., Luciani P., Mandyam R. A. et al. 2008. « Comparison of Vertebrate and Invertebrate CLIC Proteins: The Crystal Structures OfCaenorhabditis Elegans EXC-4 AndDrosophila Melanogaster DmCLIC ». *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 71 (1): 364-78. https://doi.org/10.1002/prot.21704.

Liu Y.-J., Han X.-M., Ren L.-L., Yang H.-L. et 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 PHYSIOLOGY* 161 (2): 773-86. https://doi.org/10.1104/pp.112.205815.

Lo Piero A. R., Mercurio V., Puglisi I. et Petrone G. 2010. « Different Roles of Functional Residues in the Hydrophobic Binding Site of Two Sweet Orange Tau Glutathione S-Transferases: Functional Role of the GST H-Site Residues ». *FEBS Journal* 277 (1): 255-62. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07481.x.

Lorenz P., Roychowdhury S., Engelmann M., Wolf G. et Horn T. F. W. 2003. « Oxyresveratrol and Resveratrol Are Potent Antioxidants and Free Radical Scavengers: Effect on Nitrosative and Oxidative Stress Derived from Microglial Cells ». *Nitric Oxide* 9 (2): 64-76. https://doi.org/10.1016/j.niox.2003.09.005.

Lu S. C. 2001. « Regulation of Glutathione Synthesis ». In *Current Topics in Cellular Regulation*, 36:95-116. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0070-2137(01)80004-2.

Lv F., Zhou J., Zeng L. et Xing D. 2015. « β-Cyclocitral Upregulates Salicylic Acid Signalling to Enhance Excess Light Acclimation in *Arabidopsis* ». *Journal of Experimental Botany* 66 (15): 4719-32. https://doi.org/10.1093/jxb/erv231.

Lyu K., Gu L., Li B., Lu Y., Wu C., Guan H. et Yang Z. 2016. « Stress-Responsive Expression of a Glutathione S-Transferase (Delta) Gene in Waterflea Daphnia Magna Challenged by Microcystin-Producing and Microcystin-Free Microcystis Aeruginosa ». *Harmful Algae* 56 (juin): 1-8. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.04.009.

# *M*

Ma X.-X., Jiang Y.-L., He Y.-X., Bao R., Chen Y. et Zhou C.-Z. 2009. « Structures of Yeast Glutathione-*S* -transferase Gtt2 Reveal a New Catalytic Type of GST Family ». *EMBO Reports* 10 (12): 1320-26. https://doi.org/10.1038/embor.2009.216.

Mahmood Q., Ahmad R., Kwak S.-S., Rashid A. et Anjum N. A. 2010. « Ascorbate and Glutathione: Protectors of Plants in Oxidative Stress ». In *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*, édité par Naser A. Anjum, Ming-Tsair Chan, et Shahid Umar, 209-29. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9404-9_7.

Malik A., Fouad D., Labrou N. E., Al-Senaidy A. M., Ismael M. A., Saeed H. M. et Ataya F. S. 2016. « Structural and Thermodynamic Properties of Kappa Class Glutathione Transferase from Camelus Dromedarius ». *International Journal of Biological Macromolecules* 88: 313-19. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.065.

Manevich Y., Feinstein S. I. et Fisher A. B. 2004. « Activation of the Antioxidant Enzyme 1-CYS Peroxiredoxin Requires Glutathionylation Mediated by Heterodimerization with GST ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (11): 3780-85. https://doi.org/10.1073/pnas.0400181101.

Manevich Y., Hutchens S., Tew K. D. et Townsend D. M. 2013. « Allelic Variants of Glutathione S-Transferase P1-1 Differentially Mediate the Peroxidase Function of Peroxiredoxin VI and Alter Membrane Lipid Peroxidation ». *Free Radical Biology and Medicine* 54 (janvier): 62-70. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.556.

Marinova K., Pourcel L., Weder B., Schwarz M., Barron D., Routaboul J.-M., Debeaujon I. et Klein M. 2007. « The *Arabidopsis* MATE Transporter TT12 Acts as a Vacuolar Flavonoid/$H^+$-Antiporter Active in Proanthocyanidin-Accumulating Cells of the Seed Coat ». *The Plant Cell* 19 (6): 2023-38. https://doi.org/10.1105/tpc.106.046029.

Marrs K. A., Alfenito M. R., Lloyd A. M. et Walbot V. 1995. « A Glutathione S-Transferase Involved in Vacuolar Transfer Encoded by the Maize Gene Bronze-2 ». *Nature* 375 (6530): 397-400. https://doi.org/10.1038/375397a0.

Mathieu Y., Prosper P., Buée M., Dumarçay S., Favier F., Gelhaye E., Gérardin P. et al. 2012. « Characterization of a *Phanerochaete Chrysosporium* Glutathione Transferase Reveals a Novel Structural and Functional Class with Ligandin Properties ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (46): 39001-11. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.402776.

Mathieu Y., Prosper P., Favier F.,Harvengt L., Didierjean C., Jacquot J.-P., Morel-Rouhier M. et Eric Gelhaye. 2013. « Diversification of Fungal Specific Class A Glutathione Transferases in Saprotrophic Fungi ». *PLoS ONE* 8 (11): e80298. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080298.

Meister A. 1988. « On the Discovery of Glutathione ». *Trends in Biochemical Sciences* 13 (5): 185-88. https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90148-X.

Meng F., Zhang Y., Liu F., Guo X. et Xu B. 2014. « Characterization and mutational analysis of omega-class GST (GSTO1) from Apis cerana cerana, a gene involved in response to oxidative stress ». *PloS one* 9 (3): e93100.

Meux E., Morel M., Lamant T., Gérardin P., Jacquot J.-P., Dumarçay S. et Gelhaye E. 2013. « New Substrates and Activity of Phanerochaete Chrysosporium Omega Glutathione Transferases ». *Biochimie* 95 (2): 336-46. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.10.003.

Meux E., Prosper P., Masai E., Mulliert G., Dumarçay S., Morel M., Didierjean C., Gelhaye E. et Favier F. 2012. « *Sphingobium* Sp. SYK-6 LigG Involved in Lignin Degradation Is Structurally and Biochemically Related to the Glutathione Transferase Omega Class ». *FEBS Letters* 586 (22): 3944-50. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.09.036.

Meux E., Prosper P., Ngadin A., Didierjean C., Morel M., Dumarçay S., Lamant T., Jacquot J.-P., Favier F. et Gelhaye E. 2011. « Glutathione Transferases of *Phanerochaete Chrysosporium*: S-Glutathionyl-p-Hydroquinone Reductase Belongs to a New Structural Class ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (11): 9162-73. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194548.

Migdal C. et Serres M. 2011. « Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant ». *médecine/ sciences* 27 (4): 405-12. https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017.

Molin E. U. et Mattsson J. G. 2008. « Effect of Acaricides on the Activity of Glutathione Transferases from the Parasitic Mite *Sarcoptes Scabiei* ». *Parasitology* 135 (1): 115-23. https://doi.org/10.1017/S0031182007003472.

Momose M., Itoh Y., Umemoto N., Nakayama M. et Ozeki Y. 2013. « Reverted Glutathione S-Transferase-like Genes That Influence Flower Color Intensity of Carnation (Dianthus Caryophyllus L.) Originated from Excision of a Transposable Element ». *Breeding Science* 63 (4): 435-40. https://doi.org/10.1270/jsbbs.63.435.

Monticolo F., Colantuono C. et Chiusano M. L. 2017. « Shaping the Evolutionary Tree of Green Plants: Evidence from the GST Family ». *Scientific Reports* 7 (1). https://doi.org/10.1038/ s41598-017-14316-w.

Morel F. et Aninat C. 2011. « The Glutathione Transferase Kappa Family ». *Drug Metabolism Reviews* 43 (2): 281-91. https://doi.org/10.3109/03602532.2011.556122.

Morel M., Meux E., Mathieu Y., Thuillier A., Chibani K., Harvengt L., Jacquot J.-P. et Gelhaye E. 2013. « Xenomic Networks Variability and Adaptation Traits in Wood Decaying Fungi: Fungal Xenomic Networks ». *Microbial Biotechnology* 6 (3): 248-63. https:// doi.org/10.1111/1751-7915.12015.

Morel M., Ngadin A. A., Droux M., Jacquot J.-P. et Gelhaye. E 2009. « The Fungal Glutathione S-Transferase System. Evidence of New Classes in the Wood-Degrading Basidiomycete Phanerochaete Chrysosporium ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (23): 3711-25. https://doi.org/10.1007/s00018-009-0104-5.

Morgenstern R. 2005. « Microsomal glutathione transferase 1 ». *Methods in enzymology* 401: 136-46.

Morgenstern R., Lundqvist G., Andersson G., Balk L. et Depierre J. W. 1984. « The distribution of microsomal glutathione transferase among different organelles, different organs, and different organisms ». *Biochemical pharmacology* 33 (22): 3609-14.

Moriyama Y., Hiasa M., Matsumoto T. et Omote H. 2008. « Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE)-Type Proteins as Anchor Transporters for the Excretion of Metabolic Waste Products and Xenobiotics ». *Xenobiotica* 38 (7-8): 1107-18. https://doi.org/10.1080/00498250701883753.

Mueller L. A., Goodman C. D., Silady R. A. et Walbot V. 2000. « AN9, a Petunia Glutathione S-Transferase Required for Anthocyanin Sequestration, Is a Flavonoid-Binding Protein ». *Plant Physiology* 123 (4): 1561-70.

Müller I. 2017. « Guidelines for the successful generation of protein–ligand complex crystals ». *Acta Crystallographica Section D Structural Biology* 73 (2): 79-92. https://doi.org/10.1107/S2059798316020271.

Müller S., Liebau E., Walter R. D. et Krauth-Siegel R. L. 2003. « Thiol-Based Redox Metabolism of Protozoan Parasites ». *Trends in Parasitology* 19 (7): 320-28. https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00141-7.

Munro A. W. et Lindsay J. G. 1996. « Bacterial Cytochromes P-450 ». *Molecular Microbiology* 20 (6): 1115-25. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02632.x.

Munyampundu J.-P., Xu Y.-P. et Cai X.-Z. 2016. « Phi Class of Glutathione S-Transferase Gene Superfamily Widely Exists in Nonplant Taxonomic Groups ». *Evolutionary Bioinformatics* 12 (janvier): EBO.S35909. https://doi.org/10.4137/EBO.S35909.

# *N*

Nagel R., Schmidt A. et Peters R. J. 2019. « Isoprenyl Diphosphate Synthases: The Chain Length Determining Step in Terpene Biosynthesis ». *Planta* 249 (1): 9-20. https://doi.org/10.1007/s00425-018-3052-1.

Nakayama T., Takahashi S. et Waki T. 2019. « Formation of Flavonoid Metabolons: Functional Significance of Protein-Protein Interactions and Impact on Flavonoid Chemodiversity ». *Frontiers in Plant Science* 10 (juillet): 821. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00821.

Nazir F., Fariduddin Q. et Khan T. A. 2020. « Hydrogen Peroxide as a Signalling Molecule in Plants and Its Crosstalk with Other Plant Growth Regulators under Heavy Metal Stress ». *Chemosphere* 252: 126486. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126486.

Newton G. L., Buchmeier N. et Fahey R. C. 2008. « Biosynthesis and Functions of Mycothiol, the Unique Protective Thiol of Actinobacteria ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72 (3): 471-94. https://doi.org/10.1128/MMBR.00008-08.

Ngameni B., Kuete V., Simo I.K., Mbaveng A.T., Awoussong P.K., Patnam R., Roy R. et Ngadjui B.T. 2009. « Antibacterial and Antifungal Activities of the Crude Extract and Compounds from Dorstenia Turbinata (Moraceae) ». *South African Journal of Botany* 75 (2): 256-61. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.11.006.

Ni H., Peng L., Gao X., Ji H., Ma J., Li Y. et Jiang S. 2019. « Effects of Maduramicin on Adult Zebrafish (Danio Rerio): Acute Toxicity, Tissue Damage and Oxidative Stress ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 168: 249-59. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.040.

Nishikimi M et Yagi K. 1991. « Molecular Basis for the Deficiency in Humans of Gulonolactone Oxidase, a Key Enzyme for Ascorbic Acid Biosynthesis ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 54 (6): 1203S-1208S. https://doi.org/10.1093/ajcn/54.6.1203s.

Noctor G. et Foyer C. H. 1998. « ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49 (1): 249-79. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249.

# *O*

Omura T. 2005. « Heme–Thiolate Proteins ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338 (1): 404-9. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.267.

Omura T. et Sato R. 1962. « A new cytochrome in liver microsomes ». *Journal of Biological Chemistry* 237 (4): PC1375-76.

Ortelli F., Rossiter L. C., Vontas J., Ranson H. et Hemingway J. 2003. « Heterologous Expression of Four Glutathione Transferase Genes Genetically Linked to a Major Insecticide-Resistance Locus from the Malaria Vector Anopheles Gambiae ». *Biochemical Journal* 373 (3): 957-63. https://doi.org/10.1042/bj20030169.

Osman W. H., Lin M.-I, Kondo K., Nagata T. et Katahira M. 2018. « Characterization of the Glutathione S-Transferases That Belong to the GSTFuA Class in Ceriporiopsis Subvermispora: Implications in Intracellular Detoxification and Metabolism of Wood-Derived Compounds ». *International Journal of Biological Macromolecules* 113: 1158-66. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.029.

Osman W. H., Mikami B., Saka N., Kondo K., Lin M.-I, Nagata T. et Katahira M. 2019. « Identification of Key Residues for Activities of Atypical Glutathione S-Transferase of Ceriporiopsis Subvermispora, a Selective Degrader of Lignin in Woody Biomass, by Crystallography and Functional Mutagenesis ». *International Journal of Biological Macromolecules* 132 (juillet): 222-29. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.199.

Osman W. H., Mikami B., Saka N., Kondo K., Nagata T. et Katahira M. 2019. « Structure of a Serine-Type Glutathione S-Transferase of Ceriporiopsis Subvermispora and Identification of the Enzymatically Important Non-Canonical Residues by Functional Mutagenesis ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 510 (1): 177-83. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.076.

# *P*

Pan M.-H., Lai C.-S. et Ho C.-T. 2010. « Anti-Inflammatory Activity of Natural Dietary Flavonoids ». *Food & Function* 1 (1): 15. https://doi.org/10.1039/c0fo00103a.

Pan R., Gao X.H., Lu D., Xu X.X., Xia Y.F. et Dai Y. 2011. « Prevention of FGF-2-Induced Angiogenesis Induced Angiogenesis by Scopoletin, a Coumarin Compound Isolated from Erycibe Obtusifolia Benth, and Its Mechanism of Action ». *International Immunopharmacology* 11 (12): 2007-16. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.08.012.

Pandey T., Chhetri G., Chinta R., Kumar B., Singh D. B., Tripathi T. et Singh A. K. 2015. « Functional Classification and Biochemical Characterization of a Novel Rho Class Glutathione *S* -Transferase in *Synechocystis* PCC 6803 ». *FEBS Open Bio* 5 (1): 1-7. https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.11.006.

Pandey T., Shukla R., Shukla H., Sonkar A., Tripathi T. et Singh A. K. 2017. « A Combined Biochemical and Computational Studies of the Rho-Class Glutathione s-Transferase Sll1545 of Synechocystis PCC 6803 ». *International Journal of Biological Macromolecules* 94: 378-85. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.040.

Pandey T., Singh S. K., Chhetri G., Tripathi T. et Singh A. K. 2015. « Characterization of a Highly PH Stable Chi-Class Glutathione S-Transferase from Synechocystis PCC 6803 ». *PLOS ONE* 10 (5): e0126811. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126811.

Paramasivan K. et Mutturi S. 2017. « Progress in Terpene Synthesis Strategies through Engineering of *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Critical Reviews in Biotechnology* 37 (8): 974-89. https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1299679.

Pathak M. A., Daniels Jr F. et Fitzpatrick T. B. 1962. « The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants ». *Journal of investigative Dermatology* 39 (3): 225-39.

Pavlidi N., Tseliou V., Riga M., Nauen R., Van Leeuwen T., Labrou N. E. et Vontas J. 2015. « Functional Characterization of Glutathione S-Transferases Associated with Insecticide Resistance in Tetranychus Urticae ». *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121: 53-60. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.009.

Pearson W. R. 2005. « Phylogenies of Glutathione Transferase Families ». In *Methods in Enzymology*, 401:186-204. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01012-8.

Pégeot H., Mathiot S., Perrot T., Gense F., Hecker A., Didierjean C. et Rouhier N. 2017. « Structural Plasticity among Glutathione Transferase Phi Members: Natural Combination of Catalytic Residues Confers Dual Biochemical Activities ». *The FEBS Journal* 284 (15): 2442-63. https://doi.org/10.1111/febs.14138.

Perally S., LaCourse E. J., Campbell A. M. et Brophy P. M. 2008. « Heme Transport and Detoxification in Nematodes: Subproteomics Evidence of Differential Role of Glutathione Transferases ». *Journal of Proteome Research* 7 (10): 4557-65. https://doi.org/10.1021/pr800395x.

Perito B., Allocati N., Casalone E., Masulli M., Dragani B., Polsinelli M., Aceto A. et Di Ilio C. 1996. « Molecular cloning and overexpression of a glutathione transferase gene from Proteus mirabilis ». *Biochemical Journal* 318 (1): 157-62.

Perrot T. "Diversité fonctionnelle des systèmes de détoxication chez les champignons lignolytiques". Thèse de Doctorat soutenue le 26 septembre 2018.

Perrot T., Schwartz M., Saiag F., Salzet G., Dumarçay S., Favier F., Gérardin P., et al. 2018. « Fungal Glutathione Transferases as Tools to Explore the Chemical Diversity of Amazonian Wood Extractives ». *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 6 (10): 13078-85. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b02636.

Petit E., Michelet X., Rauch C., Bertrand-Michel J., Tercé F., Legouis R. et Morel F. 2009. « Glutathione Transferases Kappa 1 and Kappa 2 Localize in Peroxisomes and Mitochondria, Respectively, and Are Involved in Lipid Metabolism and Respiration in Caenorhabditis Elegans: Glutathione Transferase Kappa in C. Elegans ». *FEBS Journal* 276 (18): 5030-40. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07200.x.

Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S. et Vianello A. 2013. « Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (7): 14950-73. https://doi.org/10.3390/ijms140714950.

Piślewska-Bednarek M., Nakano R. T., Hiruma K., Pastorczyk M., Sanchez-Vallet A., Singkaravanit-Ogawa S., Ciesiołka D., et al. 2018. « Glutathione Transferase U13 Functions in Pathogen-Triggered Glucosinolate Metabolism ». *Plant Physiology* 176 (1): 538-51. https://doi.org/10.1104/pp.17.01455.

Poumale H. M. P., Hamm R., Zang Y., Shiono Y. et Kuete V. 2013. « Coumarins and Related Compounds from the Medicinal Plants of Africa ». In *Medicinal Plant Research in Africa*, 261-300. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00008-4.

Prabhu K. S., Reddy P. V., Jones E. C., Liken A. D. et Reddy C. C. 2004. « Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes ». *Archives of biochemistry and biophysics* 424 (1): 72-80.

# Q

Qian Y., Zhang S., Yao S., Xia J., Li Y., Dai X., Wang W., et al. 2018. « Effects of Vitro Sucrose on Quality Components of Tea Plants (Camellia Sinensis) Based on Transcriptomic and Metabolic Analysis ». *BMC Plant Biology* 18 (1): 121. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1335-0.

# R

Radyukina N. L., Mikheeva L. E. et Karbysheva E. A. 2019. « Low Molecular Weight Antioxidants in Cyanobacteria and Plant Cells ». *Biology Bulletin Reviews* 9 (6): 520-31. https://doi.org/10.1134/S2079086419060045.

Ranson H., Rossiter L., Ortelli F., Jensen B., Wang X., Roth C. W., Collins F. H. et Hemingway J. 2001. « Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector Anopheles gambiae ». *Biochemical Journal* 359 (2): 295-304.

Raza H. 2011. « Dual Localization of Glutathione S-Transferase in the Cytosol and Mitochondria: Implications in Oxidative Stress, Toxicity and Disease: Dual Localization of Glutathione Transferase ». *FEBS Journal* 278 (22): 4243-51. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08358.x.

Remy E. et Duque P. 2014. « Beyond cellular detoxification: a plethora of physiological roles for MDR transporter homologs in plants ». *Frontiers in Physiology* 5 (mai). https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00201.

Reumann S., Quan S., Aung K., Yang P., Manandhar-Shrestha K., Holbrook D., Linka N., 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 PHYSIOLOGY* 150 (1): 125-43. https://doi.org/10.1104/pp.109.137703.

Rinaldi C., Kohler A., Frey P., Duchaussoy F., Ningre N., Couloux A., Wincker P., 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): 347-66. https://doi.org/10.1104/pp.106.094987.

Robert-Hazotte A., Faure P., Neiers F., Potin C., Artur Y., Coureaud G. et Jean-Marie Heydel. 2019. « Nasal Mucus Glutathione Transferase Activity and Impact on Olfactory Perception and Neonatal Behavior ». *Scientific Reports* 9 (1): 3104. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39495-6.

Robinson A., Huttley G. A., Booth H. S. et Board P. G. 2004. « Modelling and Bioinformatics Studies of the Human Kappa-Class Glutathione Transferase Predict a Novel Third Glutathione Transferase Family with Similarity to Prokaryotic 2-Hydroxychromene-2-Carboxylate Isomerases ». *Biochemical Journal* 379 (3): 541-52. https://doi.org/10.1042/bj20031656.

Rocha-Santos C., Bastos F. F., Dantas R. F., Hauser-Davis R. A., Rodrigues L. C., Cunha Bastos V. L. F., Cunha Bastos J. 2018. « Glutathione Peroxidase and Glutathione S-Transferase in Blood and Liver from a Hypoxia-Tolerant Fish under Oxygen Deprivation ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 163 (novembre): 604-11. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.089.

Römheld V. et Marschner H. 1983. « Mechanism of Iron Uptake by Peanut Plants: I. Fe $^{III}$ Reduction, Chelate Splitting, and Release of Phenolics ». *Plant Physiology* 71 (4): 949-54. https://doi.org/10.1104/pp.71.4.949.

Roret T., Alloing G., Girardet J.-M., Perrot T., Dhalleine T., Couturier J., Frendo P., Didierjean C. et Rouhier N. 2020. « Sinorhizobium Meliloti YrbA Binds Divalent Metal Cations Using Two Conserved Histidines ». *Bioscience Reports* 40 (10). https://doi.org/10.1042/BSR20202956.

Roret T., Thuillier A., Favier F., Gelhaye E., Didierjean C. et Morel-Rouhier M. 2015. « Evolutionary Divergence of Ure2pA Glutathione Transferases in Wood Degrading Fungi ». *Fungal Genetics and Biology* 83 : 103-12. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.09.002.

Rossjohn J., Polekhina G., Feil S. C., Allocati N., Masulli M., Di Ilio C. et Parker M. W. 1998. « A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications ». *Structure* 6 (6): 721-34.

Rouhier N., Lemaire S. D. et Jacquot J.-P. 2008. « The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation ». *Annual Review of Plant Biology* 59 (1): 143-66. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092811.

Rouhier N., Vieira Dos Santos C., Tarrago L. et Rey P.. 2006. « Plant Methionine Sulfoxide Reductase A and B Multigenic Families ». *Photosynthesis Research* 89 (2-3): 247-62. https://doi.org/10.1007/s11120-006-9097-1.

Rustgi S., Springer A., Kang C., von Wettstein D., Christiane Reinbothe C., Reinbothe S. et Pollmann S. 2019. « ALLENE OXIDE SYNTHASE and HYDROPEROXIDE LYASE, Two Non-Canonical Cytochrome P450s in *Arabidopsis Thaliana* and Their Different Roles in Plant Defense ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (12): 3064. https://doi.org/10.3390/ijms20123064.

# *S*

Saisawang C., Wongsantichon J. et Ketterman A. J. 2012. « A Preliminary Characterization of the Cytosolic Glutathione Transferase Proteome from Drosophila Melanogaster ». *Biochemical Journal* 442 (1): 181-90. https://doi.org/10.1042/BJ20111747.

Sakaguchi M., Tomiyoshi R., Kuroiwa T., Mihara K. et Omura T. 1992. « Functions of Signal and Signal-Anchor Sequences Are Determined by the Balance between the Hydrophobic Segment and the N-Terminal Charge. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (1): 16-19. https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.16.

Samarasinghe K. T. G., Munkanatta Godage D. N. P., VanHecke G. C. et Ahn Y.-H. 2014. « Metabolic Synthesis of Clickable Glutathione for Chemoselective Detection of Glutathionylation ». *Journal of the American Chemical Society* 136 (33): 11566-69. https://doi.org/10.1021/ja503946q.

Samarasinghe K. T. G., Munkanatta Godage D. N. P., Zhou Y., Ndombera F. T., Weerapana E. et Ahn Y.-H. 2016. « A Clickable Glutathione Approach for Identification of Protein Glutathionylation in Response to Glucose Metabolism ». *Molecular BioSystems* 12 (8): 2471-80. https://doi.org/10.1039/C6MB00175K.

Samaraweera A. V., Sandamalika W. M. G., Liyanage D. S., Lee S., Priyathilaka T. T. et Lee J. 2019. « Molecular Characterization and Functional Analysis of Glutathione S-Transferase Kappa 1 (GSTκ1) from the Big Belly Seahorse (Hippocampus Abdominalis): Elucidation of Its Involvement in Innate Immune Responses ». *Fish & Shellfish Immunology* 92: 356-66. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.010.

Sandamalika W.M. G., Priyathilaka T. T., Liyanage D. S., Lee S., Lim H.-K. et Lee J. 2018. « Molecular Characterization of Kappa Class Glutathione S-Transferase from the Disk Abalone (Haliotis Discus Discus) and Changes in Expression Following Immune and Stress Challenges ». *Fish & Shellfish Immunology* 77 (juin): 252-63. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.058.

Saruta F., Yamada N. et Yamamoto K. 2019. « Functional Analysis of an Epsilon-Class Glutathione S-Transferase From Nilaparvata Lugens (Hemiptera: Delphacidae) ». Édité par Joanna Chiu. *Journal of Insect Science* 19 (5): 14. https://doi.org/10.1093/jisesa/iez096.

Sawicki R., Singh S. P., Mondal A. K., Beneš H. et Piotr Zimniak. 2003. « Cloning, Expression and Biochemical Characterization of One Epsilon-Class (GST-3) and Ten Delta-Class (GST-1) Glutathione S-Transferases from Drosophila Melanogaster, and Identification of Additional Nine Members of the Epsilon Class ». *Biochemical Journal* 370 (2): 661-69. https://doi.org/10.1042/bj20021287.

Saxena S. C., Salvi P., Kamble N. U., Joshi P. K., Majee M. et Arora S. 2020. « Ectopic Overexpression of Cytosolic Ascorbate Peroxidase Gene (Apx1) Improves Salinity Stress Tolerance in Brassica Juncea by Strengthening Antioxidative Defense Mechanism ». *Acta Physiologiae Plantarum* 42 (4): 45. https://doi.org/10.1007/s11738-020-3032-5.

Schmid N. B., Giehl R. F. H., Doll S., Mock H.-P., Strehmel N., Scheel D., Kong X., Hider R. C. et von Wiren N. 2014. « Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-Dependent Coumarins Mediate Iron Acquisition from Alkaline Substrates in Arabidopsis ». *PLANT PHYSIOLOGY* 164 (1): 160-72. https://doi.org/10.1104/pp.113.228544.

Schwartz M. "Diversité structurale des Glutathion Transférases fongiques des classes Oméga et Xi et Xi et identification de leurs ligands par des approches cristallographiques". Thèse de Doctorat soutenue le 25 septembre 2018

Schwartz M., Didierjean C., Hecker A., Girardet J.-M., Morel-Rouhier M., Gelhaye E. et Favier F. 2016. « Crystal Structure of Saccharomyces Cerevisiae ECM4, a Xi-Class Glutathione Transferase That Reacts with Glutathionyl-(Hydro)Quinones ». *PLOS ONE* 11 (10): e0164678. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164678.

Schwartz M., Perrot T., Aubert E., Dumarçay S., Favier F., Gérardin P., Morel-Rouhier M. et al. 2018. « Molecular Recognition of Wood Polyphenols by Phase II Detoxification Enzymes of the White Rot Trametes Versicolor ». *Scientific Reports* 8 (1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-26601-3.

Selim Y. et Ouf N. 2012. « Anti-Inflammatory New Coumarin from the Ammi Majus L ». *Organic and Medicinal Chemistry Letters* 2 (1): 1. https://doi.org/10.1186/2191-2858-2-1.

Sharma R., Sahoo A., Devendran R. et Jain M. 2014. « Over-Expression of a Rice Tau Class Glutathione S-Transferase Gene Improves Tolerance to Salinity and Oxidative Stresses in Arabidopsis ». *PLoS ONE* 9 (3): e92900. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092900.

Sharma R., Yang Y., Sharma A., Awasthi S. et Awasthi Y. C. 2004. « Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis ». *Antioxidants and Redox Signaling* 6 (2): 289-300.

Sharova E. I., Medvedev S. S. et Demidchik V. V. 2020. « Ascorbate in the Apoplast: Metabolism and Functions ». *Russian Journal of Plant Physiology* 67 (2): 207-20. https://doi.org/10.1134/S1021443720020156.

Sheu G. T. et Traugh J. A. 1997. « Recombinant Subunits of Mammalian Elongation Factor 1 Expressed in Escherichia Coli. Subunit Interactions, Elongation Activity, and Phosphorylation by Protein Kinase CKII ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (52): 33290-97.

Shi M.-Z. et Xie D.-Y. 2014. « Biosynthesis and Metabolic Engineering of Anthocyanins in *Arabidopsis thaliana* ». *Recent Patents on Biotechnology* 8 (1): 47-60. https://doi.org/10.2174/1872208307666131218123538.

Shoji T. 2014. « ATP-Binding Cassette and Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporters in Plants ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, 309:303-46. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800255-1.00006-5.

Si M., Che C., Li G., Li X., Gong Z., Liu J., Yang G. et Chen C. 2019. « Characterization of Xi-Class Mycothiol S-Transferase from Corynebacterium Glutamicum and Its Protective Effects in Oxidative Stress ». *Microbial Cell Factories* 18 (1): 182. https://doi.org/10.1186/s12934-019-1232-8.

Sies H. 2017. « Hydrogen Peroxide as a Central Redox Signaling Molecule in Physiological Oxidative Stress: Oxidative Eustress ». *Redox Biology* 11: 613-19. https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035.

Sies H. et Jones D. P. 2020. « Reactive Oxygen Species (ROS) as Pleiotropic Physiological Signalling Agents ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (7): 363-83. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3.

Sisó-Terraza P., Luis-Villarroya A., Fourcroy P., Briat J.-F., Abadía A., Gaymard F., Abadía J. et Álvarez-Fernández A. 2016. « Accumulation and Secretion of Coumarinolignans and other Coumarins in *Arabidopsis thaliana* Roots in Response to Iron Deficiency at High pH ». *Frontiers in Plant Science* 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01711.

Škerlová J., Lindström H., Gonis E., Sjödin B., Neiers F., Stenmark P. et Mannervik B. 2020. « Structure and Steroid Isomerase Activity of *Drosophila* Glutathione Transferase E14 Essential for Ecdysteroid Biosynthesis ». *FEBS Letters* 594 (7): 1187-95. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13718.

Skopelitou K., Dhavala P., Papageorgiou A. C. et Labrou N. E. 2012. « A Glutathione Transferase from Agrobacterium Tumefaciens Reveals a Novel Class of Bacterial GST Superfamily ». *PLoS ONE* 7 (4): e34263. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034263.

Skopelitou K., Muleta A. W., Papageorgiou A. C., Chronopoulou E. et Labrou N. E. 2015. « Catalytic Features and Crystal Structure of a Tau Class Glutathione Transferase from Glycine Max Specifically Upregulated in Response to Soybean Mosaic Virus Infections ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1854 (2): 166-77. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.11.008.

Smirnoff N. 2018. « Ascorbic Acid Metabolism and Functions: A Comparison of Plants and Mammals ». *Free Radical Biology and Medicine* 122: 116-29. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.

Smirnoff N. et Arnaud D. 2019. « Hydrogen Peroxide Metabolism and Functions in Plants ». New Plants ». *New Phytologist* 221 (3): 1197-1214. https://doi.org/10.1111/nph.15488.

Smits S. H. J., Mueller A., Grieshaber M. K. et Schmitt L. 2008. « Coenzyme- and His-tag-induced crystallization of octopine dehydrogenase ». *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 64 (Pt 9): 836-39. https://doi.org/10.1107/S1744309108025487.

Stenkamp R. E. 1994. « Dioxygen and Hemerythrin ». *Chemical Reviews* 94 (3): 715-26. https://doi.org/10.1021/cr00027a008.

Stourman N. V., Branch M. C., Schaab M. R., Harp J. M., Ladner J. E. et Armstrong R. N. 2011. « Structure and Function of YghU, a Nu-Class Glutathione Transferase Related to YfcG from *Escherichia Coli* ». *Biochemistry* 50 (7): 1274-81. https://doi.org/10.1021/bi101861a.

Su T., Wang P., Li H., Zhao Y., Lu Y., Dai P., Ren T., et al. 2018. « The Arabidopsis Catalase Triple Mutant Reveals Important Roles of Catalases and Peroxisome-Derived Signaling in Plant Development: *Arabidopsis* Catalase Triple Mutant ». *Journal of Integrative Plant Biology* 60 (7): 591-607. https://doi.org/10.1111/jipb.12649.

Su T., Xu J., Li Y., Lei L., Zhao L., Yang H., Feng J., Liu G. et Ren D. 2011. « Glutathione-Indole-3-Acetonitrile Is Required for Camalexin Biosynthesis in *Arabidopsis Thaliana* ». *The Plant Cell* 23 (1): 364-80. https://doi.org/10.1105/tpc.110.079145.

Sun T., Yuan H., Cao H., Yazdani M., Tadmor Y. et Li L. 2018. « Carotenoid Metabolism in Plants: The Metabolism in Plants: The Role of Plastids ». *Molecular Plant* 11 (1): 58-74. https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.010.

Sun Y., Li H. et Huang J.-R. 2012. « Arabidopsis TT19 Functions as a Carrier to Transport Anthocyanin from the Cytosol to Tonoplasts ». *Molecular Plant* 5 (2): 387-400. https://doi.org/10.1093/mp/ssr110.

Sylvestre-Gonon E., Law S. R., Schwartz M., Robe K., Keech O., Didierjean C., Dubos C., Rouhier N. et Hecker A. 2019. « Functional, Structural and Biochemical Features of Plant Serinyl-Glutathione Transferases ». *Frontiers in Plant Science* 10: 608. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00608.

Sylvestre-Gonon E., Schwartz M., Girardet J.-M., Hecker A. et Rouhier N. 2020. « Is There a Role for Tau Glutathione Transferases in Tetrapyrrole Metabolism and Retrograde Signalling in Plants? » *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 375 (1801): 20190404. https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0404.

# $\mathcal{T}$

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 $E_2$ Synthase *in Vitro* ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (14): 10166-75. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418475.

Tang A. H. et Tu C.-P. D. 1995. « Pentobarbital-induced changes in Drosophila glutathione S-transferase D21 mRNA stability ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (23): 13819-25.

Tholl D. 2015. « Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants ». In *Biotechnology of Isoprenoids*, 148:63-106. Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology. https://doi.org/10.1007/10_2014_295.

Thom R., Cummins I., Dixon D. P., Edwards R., Cole D. J. et Lapthorn A. J. 2002a. « Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification ». *Biochemistry* 41 (22): 7008-20.

Thuillier A., Chibani K., Belli G., Herrero E., Dumarçay S., Gérardin P., Kohler A., et al. 2014. « Transcriptomic Responses of Phanerochaete Chrysosporium to Oak Acetonic Extracts: Focus on a New Glutathione Transferase ». *Applied and Environmental Microbiology* 80 (20): 6316-27. https://doi.org/10.1128/AEM.02103-14.

Thuillier A., Roret T., Favier F., Gelhaye E., Jacquot J.-P., Didierjean C. et Morel-Rouhier M. 2013. « Atypical Features of a Ure2p Glutathione Transferase from *Phanerochaete Chrysosporium* ». *FEBS Letters* 587 (14): 2125-30. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.031.

Tippmann S., Chen Y., Siewers V. et Nielsen J. 2013. « From Flavors and Pharmaceuticals to Advanced Biofuels: Production of Isoprenoids in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Biotechnology Journal* 8 (12): 1435-44. https://doi.org/10.1002/biot.201300028.

Tissot N. "Etude des régulations géniques impliquées dans le maintien de l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis thaliana*". Thèse de Doctorat soutenue le 6 décembre 2016.

Tocheva E. I., Fortin P. D., Eltis L. D. et Murphy M. E. P.. 2006. « Structures of Ternary Complexes of Ternary Complexes of BphK, a Bacterial Glutathione *S* -Transferase That Reductively Dechlorinates Polychlorinated Biphenyl Metabolites ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (41): 30933-40. https://doi.org/10.1074/jbc.M603125200.

Tomich A. D., Klontz E. H., Deredge D., Barnard J. P., McElheny C. L., Eshbach M. L., Weisz O. A., et al. 2019. « Small-Molecule Inhibitor of FosA Expands Fosfomycin Activity to Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (3): e01524-18, /aac/63/3/AAC.01524-18.atom. https://doi.org/10.1128/AAC.01524-18.

Townsend D. M. et Tew K. D. 2003. « The Role of Glutathione-S-Transferase in Anti-Cancer Drug Resistance ». *Oncogene* 22 (47): 7369-75. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940.

Triantaphylidès C. et Havaux M. 2009. « Singlet Oxygen in Plants: Production, Detoxification and Signaling ». *Trends in Plant Science* 14 (4): 219-28. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.01.008.

Trute M., Gallis B., Doneanu C., Shaffer S., Goodlett D. et Gallagher E. 2007. « Characterization of Hepatic Glutathione S-Transferases in Coho Salmon (Oncorhynchus Kisutch) ». *Aquatic Toxicology* 81 (2): 126-36. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.009.

Tuskan G. A., DiFazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., et al. 2006. « The Genome of Black Cottonwood, Populus Trichocarpa (Torr. & Gray) ». *Science* 313 (5793): 1596-1604. https://doi.org/10.1126/science.1128691.

# U

Udomsinprasert R. et Ketterman A. J. 2002. « Expression and characterization of a novel class of glutathione S-transferase from Anopheles dirus ». *Insect biochemistry and molecular biology* 32 (4): 425-33.

Udomsinprasert R., Bogoyevitch M. A. et Ketterman A. J. 2004. « Reciprocal Regulation of Regulation of Glutathione S-Transferase Spliceforms and the Drosophila c-Jun N-Terminal Kinase Pathway Components ». *Biochemical Journal* 383 (3): 483-90. https://doi.org/10.1042/BJ20040519.

Uivarosi V. et Munteanu A.-C. 2017. « Flavonoid Complexes as Promising Anticancer Metallodrugs ». In *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. InTech. https://doi.org/10.5772/67879.

Urade Y. et Eguchi N. 2002. « Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence ». *Prostaglandins & other lipid mediators* 68: 375-82.

Urade Y., Eguchi N., Aritake K. et Hayaishi O. 2004. « Functional analyses of lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases ». *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica* 123 (1): 5-13.

# V

Valenzuela-Chavira I., Contreras-Vergara C. A., Arvizu-Flores A. A., Serrano-Posada H., Lopez-Zavala A. A., García-Orozco K. D., Hernandez-Paredes J., et al. 2017. « Insights into Ligand Binding to a Glutathione S-Transferase from Mango: Structure, Thermodynamics and Kinetics ». *Biochimie* 135: 35-45. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.005.

Vanacker H., Carver T. L. W. et Foyer C. H. 1998. « Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves ». *Plant Physiology* 117 (3): 1103-14. https://doi.org/10.1104/pp.117.3.1103.

Ververidis F., Trantas E., Douglas C., Vollmer G., Kretzschmar G. et Panopoulos N. 2007. « Biotechnology of Flavonoids and Other Phenylpropanoid-Derived Natural Products. Part I: Chemical Diversity, Impacts on Plant Biology and Human Health ». *Biotechnology Journal* 2 (10): 1214-34. https://doi.org/10.1002/biot.200700084.

# W

Wagner U., Edwards R., Dixon D. P. et Mauch F. 2002. « Probing the Diversity of the Arabidopsis Glutathione S-Transferase Gene Family ». *Plant Molecular Biology* 49 (5): 515-32.

Wang B., Peng Y., Zhang T. et Ding J. 2011. « Crystal Structures and Kinetic Studies of Human Kappa Class Glutathione Transferase Provide Insights into the Catalytic Mechanism ». *Biochemical Journal* 439 (2): 215-25. https://doi.org/10.1042/BJ20110753.

Wang J., Jiang Y., Chen S., Xia X., Shi K., Zhou Y., Yu Y. et Yu J. 2010. « The Different Responses of Glutathione-Dependent Detoxification Pathway to Fungicide Chlorothalonil and Carbendazim in Tomato Leaves ». *Chemosphere* 79 (9): 958-65. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.020.

Watanabe K., Ito S. et Yamamoto S. 2008. « Studies on Membrane-Associated Prostaglandin E Synthase-2 with Reference to Production of 12L-Hydroxy-5,8,10-Heptadecatrienoic Acid (HHT) ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 367 (4): 782-86. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.029.

Waxman D. J. 1990. « Glutathione S-Transferases: Role in Alkylating Agent Resistance and Possible Target for Modulation Chemotherapy--a Review ». *Cancer Research* 50 (20): 6449-54.

Whitbread A. K., Masoumi A., Tetlow N., Schmuck E., Coggan M. et Philip G. Board. 2005. « Characterization of the Omega Class of Glutathione Transferases ». In *Methods in Enzymology*, 401:78-99. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01005-0.

Whittaker J. W. 2012. « Non-Heme Manganese Catalase – The 'Other' Catalase ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 525 (2): 111-20. https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.008.

Wickner R. B. 1994. « [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in Saccharomyces cerevisiae ». *Science* 264 (5158): 566-69.

Wiktelius E. et Stenberg G. 2007. « Novel Class of Glutathione Transferases from Cyanobacteria Exhibit High Catalytic Activities towards Naturally Occurring Isothiocyanates ». *Biochemical Journal* 406 (1): 115-23. https://doi.org/10.1042/BJ20070328.

Wink M. 2003. « Evolution of Secondary Metabolites from an Ecological and Molecular Phylogenetic Perspective ». *Phytochemistry* 64 (1): 3-19. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5.

Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G. V. et Provart N. J. 2007. « An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets ». Édité par Ivan Baxter. *PLoS ONE* 2 (8): e718. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000718.

Wongtrakul J., Sukittikul S., Saisawang C., Ketterman A. J. et Jarvis D. 2012. « Mitogen-activated protein kinase p38b interaction with delta class glutathione transferases from the fruit fly, Drosophila melanogaster ». *Journal of insect science* 12 (1).

Wu K. et Hoy M. A. 2016. « The Glutathione-S-Transferase, Cytochrome P450 and Carboxyl/Cholinesterase Gene Superfamilies in Predatory Mite Metaseiulus Occidentalis ». *PLOS ONE* 11 (7): e0160009. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160009.

# *x*

Xing H., Wang X., Sun G., Gao X., Xu S. et Wang X. 2012. « Effects of Atrazine and Chlorpyrifos on Activity and Transcription of Glutathione S-Transferase in Common Carp (Cyprinus Carpio L.) ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 33 (2): 233-44. https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.014.

Xu G., Teng Z.-W., Gu G.-X., Guo L., Wang F., Xiao S., Wang J.-L., et al. 2020. « Genomic and Transcriptomic Analyses of Glutathione S-transferases in an Endoparasitoid Wasp, *Pteromalus Puparum* ». *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 103 (2). https://doi.org/10.1002/arch.21634.

Xun L., Belchik S. M., Xun R., Huang Y., Zhou H., Sanchez E., Kang C.H., et Board P. G. 2010. « S-Glutathionyl-(Chloro)Hydroquinone Reductases: A Novel Class of Glutathione Transferases ». *Biochemical Journal* 428 (3): 419-27. https://doi.org/10.1042/BJ20091863.

# *y*

Yamada T. et 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 (28): 8414-24.

Yamamoto K., Nagaoka S., Banno Y. et Aso Y. 2009. « Biochemical Properties of an Omega-Class Glutathione S-Transferase of the Silkmoth, Bombyx Mori ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149 (4): 461-67. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.10.108.

Yamazaki M., Shibata M., Nishiyama Y., Springob K., Kitayama M., Shimada N., Aoki T., Ayabe S.-i. et Kazuki Saito. 2008. « Differential Gene Expression Profiles of Red and Green Forms of Perilla Frutescens Leading to Comprehensive Identification of Anthocyanin Biosynthetic Genes: Anthocyanin Biosynthetic Genes from Perilla ». *FEBS Journal* 275 (13): 3494-3502. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06496.x.

Yan H., Jia H., Wang X., Gao H., Guo X. et Xu B. 2013. « Identification and Characterization of an Apis Cerana Cerana Delta Class Glutathione S-Transferase Gene (AccGSTD) in Response to Thermal Stress ». *Naturwissenschaften* 100 (2): 153-63. https://doi.org/10.1007/s00114-012-1006-1.

Yang G., Xu Z., Peng S., Sun Y., Jia C. et Zhai M. 2016. « In Planta Characterization of a Tau Class Glutathione S-Transferase Gene from Juglans Regia (JrGSTTau1) Involved in Chilling Tolerance ». *Plant Cell Reports* 35 (3): 681-92. https://doi.org/10.1007/s00299-015-1912-8.

Yang J., Li W., Ng T. B., Deng X., Lin J. et Ye X. 2017. « Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation ». *Frontiers in Microbiology* 8 (mai): 832. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00832.

Yang Q., Han X.-M., Gu J.-K., Liu Y.-J., Yang M.-J. et Zeng Q.-Y. 2019. « Functional and Structural Profiles of GST Gene Family from Three *Populus* Species Reveal the Sequence–Function Decoupling of Orthologous Genes ». New Phytologist 221 (2): 1060-73. https://doi.org/10.1111/nph.15430.

Yin R., Messner B., Faus-Kessler T., Hoffmann T., Schwab W., Hajirezaei M.-R., von Saint Paul V., Heller W. et Schäffner A. R. 2012. « Feedback Inhibition of the General Phenylpropanoid and Flavonol Biosynthetic Pathways upon a Compromised Flavonol-3-O-Glycosylation ». *Journal of Experimental Botany* 63 (7): 2465-78. https://doi.org/10.1093/jxb/err416.

Yoshida H. 1883. « LXIII.—Chemistry of Lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio ». *J. Chem. Soc., Trans.* 43 (0): 472-86. https://doi.org/10.1039/CT8834300472.

Yu Y., Liang X.-F., Li L., He S., Wen Z.-Y. et Shen D. 2014. « Two Homologs of Rho-Class and Polymorphism in Alpha-Class Glutathione S-Transferase Genes in the Liver of Three Tilapias ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 101: 213-19. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.031.

# Z

Zaalishvili G. V., Khatisashvili G. A., Ugrekhelidze D. Sh, Gordeziani M. Sh et Kvesitadze G. I. 2000. « [Plant potential for detoxification (review)] ». *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia* 36 (5): 515-24.

Zámocký M. et Koller F. 1999. « Understanding the Structure and Function of Catalases: Clues from Molecular Evolution and in Vitro Mutagenesis ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 72 (1): 19-66. https://doi.org/10.1016/S0079-6107(98)00058-3.

Zerbe P. et Bohlmann J. 2015. « Plant Diterpene Synthases: Exploring Modularity and Metabolic Diversity for Bioengineering ». *Trends in Biotechnology* 33 (7): 419-28. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.04.006.

Zhan B., Perally S., Brophy P. M., Xue J., Goud G., Liu S., Deumi V., et al. 2010. « Molecular Cloning, Biochemical Characterization, and Partial Protective Immunity of the Heme-Binding Glutathione S-Transferases from the Human Hookworm Necator Americanus ». *Infection and Immunity* 78 (4): 1552-63. https://doi.org/10.1128/IAI.00848-09.

Zhang H.-C., Yang Y.-J., Ma K.-X., Shi C.-Y., Chen G.-W., et Liu D.-Z. 2020. « A Novel Sigma Class Glutathione S-Transferase Gene in Freshwater Planarian Dugesia Japonica: Cloning, Characterization and Protective Effects in Herbicide Glyphosate Stress ». *Ecotoxicology* 29 (3): 295-304. https://doi.org/10.1007/s10646-020-02173-9.

Zhang J., Zhang Y., Li J., Liu M. et Liu Z. 2016. « Midgut Transcriptome of the Cockroach Periplaneta Americana and Its Microbiota: Digestion, Detoxification and Oxidative Stress Response ». *PLOS ONE* 11 (5): e0155254. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155254.

Zhang L., Qiu L., Wu H., Liu X., You L., Pei D., Chen L., Wang Q. et Zhao J. 2012. « Expression Profiles of Seven Glutathione S-Transferase (GST) Genes from Venerupis Philippinarum Exposed to Heavy Metals and Benzo[a]Pyrene ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 155 (3): 517-27. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.01.002.

Zhang Q.-L., Dong Z.-X., Luo Z.-W., Zhang M., Deng X.-Y., Guo J., Wang F. et Lin L.-B. 2020. « The Impact of Mercury on the Genome-Wide Transcription Profile of Zebrafish Intestine ». *Journal of Hazardous Materials* 389 (mai): 121842. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121842.

Zhao J. 2015. « Flavonoid Transport Mechanisms: How to Go, and with Whom ». *Trends in Plant Science* 20 (9): 576-85. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.007.

Zou M., Hu X., Xu B., Tong T., Jing Y., Xi L., Zhou W., et al. 2018. « Glutathione S-transferase isozyme alpha 1 is predominantly involved in the cisplatin resistance of common types of solid cancer ». *Oncology Reports*. https://doi.org/10.3892/or.2018.6861.

# Annexes

# *Annexes*

**Tableau A1. Les principales classes de GST et les propriétés qui leur sont associées (Mise à jour de l'article Sylvestre-Gonon *et al.*, 2020).**
Les classes retrouvées chez les plantes sont indiquées en rouge. Un exemple de structure a été proposé, lorsque cela était possible, pour chaque type d'organisme. Le symbole Ø signifie qu'aucune structure n'est disponible dans la banque de donnée structurale PDB (protein databank). * Les résidus sérine et cystéine sont tous deux présents dans la signature du site actif (du moins de certains membres), ce qui explique que ces protéines présentent à la fois une activité de conjugaison du GSH et une activité de déglutathionylation. Les Prostaglandin-D synthétases (PGDS) ont été incluses dans la classe des GSTs sigma. DHA : déshydroascorbate.

| Classe &symbole | | Organisme | Etat oligomérique | Résidu catalytique | Activitéscatalytiques & non-catalytiques | Représentations structurales(PDB) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Alpha** | A | Mammifères, oiseaux, poissons | Dimère | Tyr | Conjugaison de GSH, réduction de peroxyde, isomérase | 1XWG, 1VF1 |
| **Bêta** | B | Bactéries | Dimère | Cys* | Conjugaison de GSH, thiol transférase | 1F2E |
| **Chi** | C | Bactéries | Dimère | ? | Conjugaison de GSH, thiol transférase | Ø |
| **Delta** | D | Insectes | Dimère | Ser | Conjugaison de GSH | 3F63 |
| **Epsilon** | E | Insectes | Dimère | Ser | Réduction de peroxyde | 2IMI |
| **Phi** | F | Plantes, champignons, bactéries, protistes | Dimère | Ser | Conjugaison de GSH, réduction de peroxyde, isomérase, ligandine, déglutathionylation* | 4RI6, Ø, Ø, Ø |
| **Eta** | E | Bactéries | Dimère | Arg | Conjugaison de GSH, transférase et réduction de peroxyde | 2YCD |
| **Hémérythrine** | H | Plantes | ? | Cys | ? | |
| **Iota** | I | Plantes | ? | Cys | ? | Ø |
| **Kappa** | K | Mammifères, bactéries, nématodes, mollusques, poissons | Dimère | Ser | Conjugaison de GSH, réduction de peroxyde, ligandine | 2IME, 1R4W |
| **Lambda** | L | Plantes | Monomère | Cys | Thiol transférase, déglutathionylation, ligandine | 4PQI |
| **Mu** | M | Mammifères, arthropodes, protozoaires | Dimère | Tyr | Conjugaison de GSH, réduction de peroxyde, isomérase, ligandine | 3GUR, 5AN1, 1Q4J |
| **Nu/Ure2p** | N | Plantes, champignons, nématodes, bactéries | Dimère | Tyr/Asn | Conjugaison de GSH, thiol-transférase et réduction de peroxyde, ligandine | 2WS2, 5UUO, 4F0B, 5HFK |
| **Oméga** | O | Mammifères, champignons, insectes | Dimère | Cys/Ser | Conjugaison de GSH, thiol transférase, DHA réductase, modulation de canaux ioniques | 1EEM, 4IS0, Ø |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Pi** | P | Mammifères, nématodes | Dimère | Tyr | Conjugaison de GSH, réduction de peroxyde, isomérase, NO transport/élimination | 1ZGN, 1TU7 |
| **Rhô** | R | Poissons, mollusques | Dimère | Ser | Conjugaison de GSH | Ø, 3QAW |
| **Sigma (PGDS inclus)** | S | Animaux, insectes, algues, trématodes | Dimère | Tyr | Conjugaison de GSH, réduction de peroxyde, isomérase, synthèse de prostaglandine | 6N4E/3VPQ, Ø, 2C80, |
| **Thêta** | T | Animaux, plantes, insectes, algues, bactéries | Dimère | Ser | Conjugaison de GSH, réduction de peroxyde | 2C3N, Ø, Ø |
| **Tau** | U | Plantes | Dimère | Ser | Conjugaison de GSH, réduction de peroxyde, ligandine | 5G5A |
| **GHR(Xi)** | - | Plantes, champignons, bactéries, archées | Dimère | Cys | DHA réductase, thiol transférase, déglutathionylation | 3PPU, 4USS, 4G0K, 6GZF |
| **Zêta** | Z | Animaux, plantes, insectes, champignons, bactéries | Dimère | Ser | Conjugaison de GSH, réduction de peroxyde, isomérase | 3N5O, 2CZ2, 1E6B, 4PXO |
| **CLIC** | - | Invertébrés, mammifères, poissons | Dimère/ Monomère | Cys/Asp | Ligandine, formation et modulation de canaux ioniques | 2YV7, 3FY7, 5YTI |
| **DHAR** | - | Plantes | Monomère | Cys | DHA réductase, thiol transférase, déglutathionylation | 2N5F |
| **EF1B** | - | Animaux, plantes, champignons, bactéries | Monomère/ Dimère | ? | Conjugaison de GSH, traduction de protéines | 1NHY, 5JPO |
| **Grx2** | - | Bactéries | Monomère | Cys | Conjugaison de GSH, estérase, thiol-transférase | 1G7O |
| **GSTFuA(GTE)** | | Champignons | Dimère | Ser/Gly | Conjugaison de GSH, réduction de peroxyde, transférase, ligandine, estérase | 4F03 |
| **GTT** | - | Champignons | Dimère | ? | Conjugaison de GSH, réduction de peroxyde | 3ERF |
| **mPGES2** | - | Mammifères, plantes, oiseaux, poissons | Dimère | Cys | Isomérase | 1Z9H |
| **Métaxine** | | Animaux, Champignons, Plantes | ? | Ser/Cys | Import de protéines dans la membrane mitochondriale | |
| **SSPA** | - | Bactéries (Francisella) | Dimère | Asp ? | Ligandine ? | 5U56 |
| **TCHQD** | - | Plantes, bactéries | Dimère | Ser | Déshalogénase | Ø, Ø |

**Tableau A2 : Oligonucléotides utilisés au cours de cette thèse.**

| Protéine | Amorce sens | Amorce anti-sens | Site de restriction | Plasmide receveur |
|---|---|---|---|---|
| **AtGSTU1** | 5'-gggggg<u>catatg</u>gcggagaaagaagagagtg-3' | 5'-ggggggg<u>aagactc</u>tcgagggcagacttaattgtctctgc-3' | *Nde*I/*Bbs*I | pET28a |
| **AtGSTU6** | 5'-gggggg<u>catatg</u>ggcaaaaatgaggaagtg-3' | 5'-ggggggg<u>aagactc</u>tcgagagcagatctaattttctctgc-3' | *Nde*I/*Bbs*I | pET28a |
| **AtGSTU7** | 5'-gggggg<u>ccatgg</u>cggagagatcaaattcag-3' | 5'-gggggg<u>ctcgag</u>agcagatttgatattgagtttc-3' | *Nco*I/*Xho*I | pET26b |
| **AtGSTU8** | 5'-gggggg<u>catatg</u>aaccaagaagagcacgtaaag-3' | 5'-gggggg<u>ctcgag</u>attagatgtaacacttccaaac-3' | *Nde*I/*Xho*I | pET28a |
| **AtGSTU16** | 5'-gggggg<u>catatg</u>ggagagaaagaggaagtg-3' | 5'-ggggggggtctc<u>ctcgag</u>agatcttgaagctgcggattg-3' | *Nde*I/*Xho*I | pET28a |
| **AtGSTU19** | 5'-gggggg<u>catatg</u>gcgaacgaggtgattcttc-3' | 5'-gggggg<u>ctcgag</u>ctcaggtacaaatttcttcctg-3' | *Nde*I/*Xho*I | pET28a |
| **AtGSTU22** | 5'-gggggg<u>catatg</u>gcggatgaagtgatacttttg-3' | 5'-gggggg<u>ctcgag</u>gacacagtatatcttcctaatc-3' | *Nde*I/*Xho*I | pET28a |
| **AtGSTU24** | 5'-gggggg<u>catatg</u>gcagatgaggtgattcttc-3' | 5'-ggggggg<u>aagactc</u>tcgagctccaacccaagtttcttcctac-3' | *Nde*I/*Bbs*I | pET28a |
| **AtGSTU25** | 5'-gggggg<u>catatg</u>caacgaggtgattcttc-3' | 5'-ggggggg<u>aagactc</u>tcgagttcgatttcgatcccaagttttttc-3' | *Nde*I/*Xho*I | pET28a |
| **PtGSTU19** | 5'-ccccccc<u>gtctccc</u>atggcagatgtgaagctgcat-3' | 5'-cccc<u>ggatccc</u>tacttgttcatcattttc-3' | *BsmB*I/*BamH*I | pET12a |
| **PtGSTU20** | 5'-cccccccgtctc<u>ccatgg</u>cagatgtgaagctgcat-3' | 5'-cccc<u>ggatccc</u>tacttgttcatcattttc-3' | *Nco*I/*BamH*I | pET12a |
| **PtGSTU27** | 5'-ccccc<u>catgg</u>ctaatgaagtggtt- 3' | 5'-cccc<u>ggatcc</u>ttattcaatccccagttc-3' | *Nco*I/*BamH*I | pET12a |
| **PtGSTU30** | 5'-cccccccc<u>catatgg</u>ctagtgatcaagtg-3' | 5'-cccc<u>ggatccc</u>tactcaataccaaact-3' | *Nde*I/*BamH*I | pET12a |
| **PtGSTU46** | 5'-ccccccc<u>catatgg</u>caggagcggtgaaac-3' | 5'-cccc<u>ggatcc</u>ttaatggtttttgaacgc-3' | *Nde*I/*BamH*I | pET12a |
| **PtGSTU52** | 5'-ccccccc<u>catatgg</u>caaacacagagcagg-3' | 5'-cccc<u>ggatcc</u>tcaagtccgaaaccagtc-3' | *Nde*I/*BamH*I | pET12a |
| | | **Mutagenèse dirigée** | | |
| **PtGSTU19 Y160A** | 5'-tggctgcaagccaagcaacgaatagtccatacgagatgtcaa-3' | 5'-ttgacatctcgtatggactattcgttgcttggcttgcagcca-3' | | |
| **PtGSTU19 Y160C** | 5'-ggctgcaagccaacaaacgaatagtccatacgagatgt-3' | 5'-acatctcgtatggactattcgtttgttggcttgcagcc-3' | | |
| **PtGSTU19 Y160F** | 5'-ggctgcaagccaaaaaacgaatagtccatacgagatgt-3' | 5'-acatctcgtatggactattcgtttttggcttgcagcc-3' | | |
| **PtGSTU20 C160Y** | 5'- ggcttcaagccaataagtgaagagtccaaatgagatgt-3' | 5'-acatctcatttggactcttcacttattggcttgaagcc-3' | | |

***N. B.*** **:** Les sites de restriction des enzymes présents sur les amorces sont soulignés.

**Tableau A3: Souches bactériennes utilisées au cours de cette thèse.**

| | Nom | Génotype | Résistance | Compétence bactérienne | Utilisation |
|---|---|---|---|---|---|
| **Souches bactériennes** | *E. coli* DH5α | *F-φ80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF) U169, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rK-mK+), supE44, relA1* | Aucune | Chimiocompétente | Propagation des différents plasmides |
| | *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS | *F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm λ* (DE3[lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS) *pRARE2 (CamR)* | Chloramphénicol | Chimiocompétente | Production des GSTUs d'*A. thaliana* à partir des vecteurs d'expression pET26b et pET28a |
| | *E. coli* BL21 (DE3) pSBET | *F- ompT hsdSB (rB-,mB-) gal dcm (DE3) pSBET (KanR)* | Kanamycine | Electrocompétente | Production des GSTUs de *P. trichocarpa* à partir du vecteur d'expression pET12a |

**Tableau A4 : Vecteurs plasmidiques utilisés au cours de cette thèse.**

| | Nom | Résistance | Utilisation |
|---|---|---|---|
| **Vecteurs plasmidiques** | pET26b-AtGSTUx | Kanamycine | Expression des protéines GSTUs d'*A.thaliana* étiquetées en position C-terminale |
| | pET28a-AtGSTU7 | Kanamycine | Expression de la protéine GSTU7 d'*A.thaliana* étiquetées en position C-terminale |
| | pET12a-PtGSTUx | Ampicilline | Expression des protéines GSTUs de *P. trichocarpa* étiquetées en position C-terminale |

**Tableau A5 : Solution utilisée pour préparer 2 gels de polyacrylamide à 15% (0,75 mm d'épaisseur).**

| Composés | Gel de séparation ( 15 %) | Gelde concentration (5 %) |
|---|---|---|
| Tris-HCl 1,5 M pH 8.85 | 1,875 mL | / |
| Tris-HCl 0,5 M pH 6.8 | / | 0,5 mL |
| H2O distillée | 2,68 mL | 1,18 mL |
| Mélange acrylamidebisacrylamide (29 :1) 40 % | 2,81 mL | 266 µL |
| SDS 20 % | 37,5 µL | 10 µL |
| Persulfate d'ammonium (APS)10% | 45 µL | 18 µL |
| Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) | 11 µL | 3,2 µL |

**Tableau A6: Solutions entrant dans la composition du milieu Hoagland.**

| | Masse Molaire (g/mol) | Concentration molaire (mM) | Concentration massique (g/l) |
|---|---|---|---|
| **Macroéléments100x** | | | |
| $KH_2PO_4$ | 136,09 | 100 | 13,609 |
| $KNO_3$ | 11,10 | 500 | 50,550 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 246,48 | 100 | 24,648 |
| **$Ca(NO_3)_2.4H_2O$100x** | | | |
| $Ca(NO_3)_2.4H_20$ | 236,15 | 500 | 118,075 |
| **Microéléments1000x** | | | |
| $H_3BO_3$ | 61,83 | 50 | 3,091 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 237,93 | 0,05 | 0,012 |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 249,69 | 0,2 | 0,050 |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 287,50 | 1,2 | 0,345 |
| KI | 166,00 | 2,5 | 0,415 |
| $MnSO_4.H_2O$ | 169,02 | 5 | 0,845 |
| $Na_2MoO_4$ | 205,92 | 0,3 | 0,072 |
| **$Fe^{3+}$-EDTA1000x** | | | |
| $Fe^{3+}$-EDTA | 367,05 | 25 | 9,176 |

**Tableau A7 : Compositiondu milieu Hoagland solide (100 mL).**

| | Volume ou quantité |
|---|---|
| Macroéléments 100x | 1 mL |
| $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ 100x | 1 mL |
| Microéléments 1000x | 0,1 mL |
| Agar | 0,7 g |
| $Fe^{3+}$-EDTA 1000x | 0,1 mL |
| Eau ultrapure | QSP 100 mL |

**Tableau A8 : Liste du matériel utilisé pour la culture en hydroponie.**

* : les boites doivent être vides et contenir leur portoir (pour cônes 1 mL ou 200 µL)

| Matériel et consommables | Utilisation |
|---|---|
| Boite de cônes 1 ml* de type Eppendorf | 1 boîte par génotype (germination des graines) |
| Barrette de tubes PCR 200 µL | 1 barrette de 8 tubes par boite |
| Boite de cônes 200 µl* de type Eppendorf | 1 boite par condition testée et par répétition |
| Feuilles d'aluminium plaque PCR (96 puits)<br>Réf VWR : 391-1282 | 1 feuille par portoir (créer obscurité pour limiter prolifération de microorganismes) |
| 2 éprouvettes 1 L | 1 dédiée au milieu +Fe et 1 au milieu -Fe |
| 2 cônes pipette 5 mL | 1 cône dédié au milieu macroélément 100x<br>1 cône dédié au milieu $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ 100x |
| Chambre de culture thermostatée | |

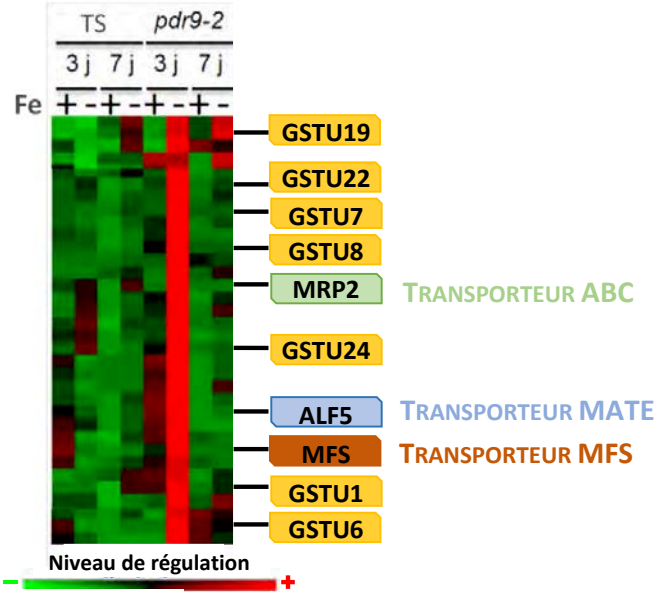



**Figure A1 : Analyse transcriptomique de gènes exprimés dans les racines de plantes sauvages (TS) ou mutées pour le gène *pdr9-2*, carencées ou non en fer après 3 ou 7 jours (Adaptée de N. Tissot, 2016, thèse).**

Carte thermique représentant les patrons d'expression d'une sélection de gènes obtenue à partir de données de puces à ADN soumises à un test ANOVA à 1%. Les gènes réprimés sont représentés en vert alors que ceux surexprimés sont en rouge. Le nom des gènes codant des GSTUs est encadré en jaune, ceux des transporteurs sont en vert, bleu ou marron en fonction du type de transporteurs.

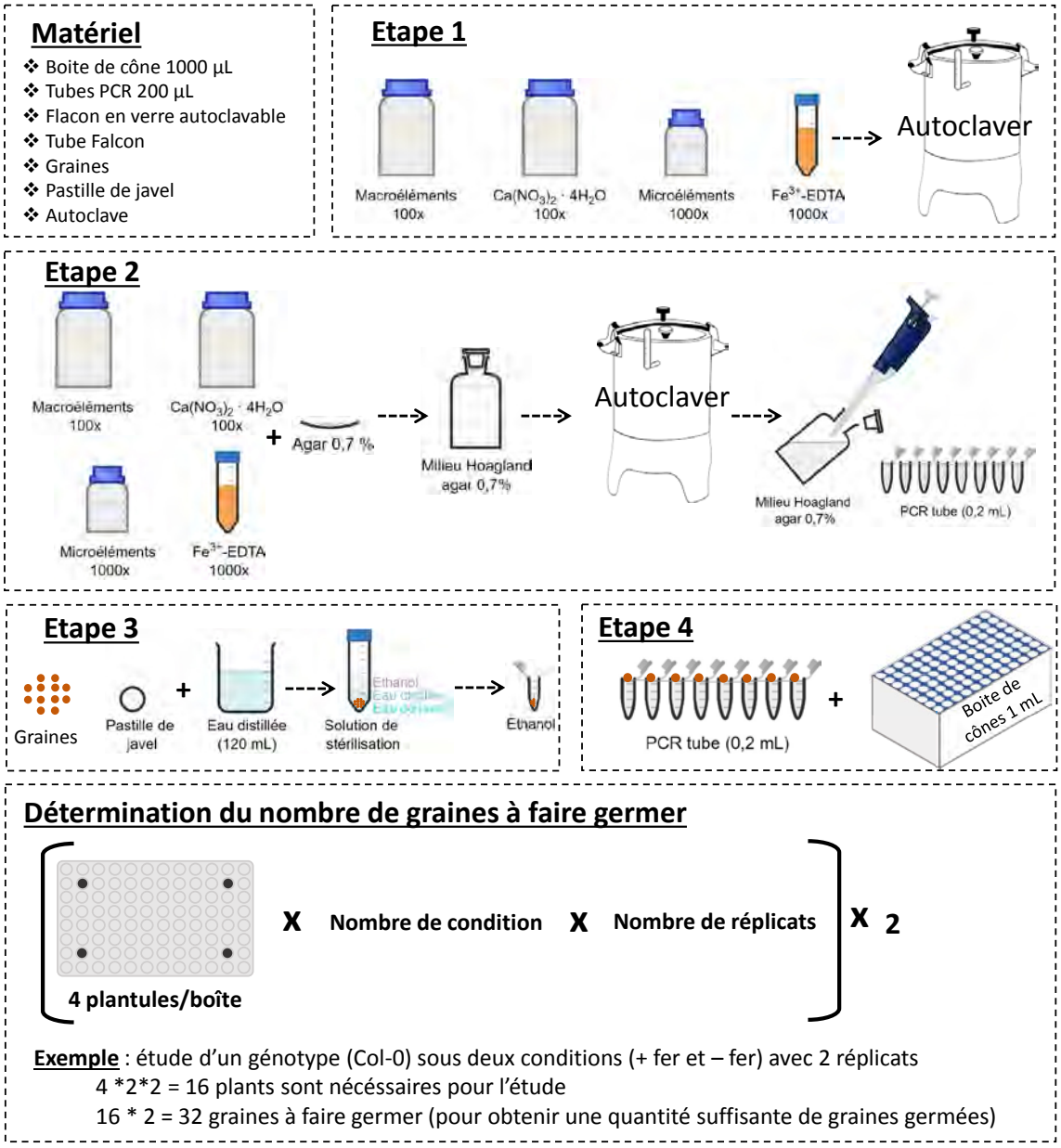



**Figure A2 : Schéma récapitulatif des étapes successives de mise en culture en hydroponie.**
Le milieu de Hoagland (tableaux A6 et A7) a été préparé et stérilisé (étape 1). Les constituants du milieu Hoagland solide (agar 0,7 %) ont été assemblés, le mélange autoclavé puis réparti dans des microtubes de 0,2 mL. Les tubes ainsi préparés sont gardés en conditions stériles (sous sorbonne) jusqu'à solidification du milieu (étape 2). Les tubes de milieu sont alors conservés stérilement à 4°C jusqu'à leur utilisation. Les graines ont été stérilisées selon le protocole suivant (étape 3). Une pastille de javel (80 % troclosène sodium dihydrate soit 45 % de chlore actif) a été dissoute dans 120 mL d'eau distillée. Après 5 minutes d'incubation dans un mélange de stérilisation contenant 4 mL de la solution fraichement préparée, 12 mL d'eau distillée et 16 mL d'éthanol absolu, les graines ont été rincées deux fois à l'éthanol absolu (2 fois 1 mL) avant d'être séchées sous hotte. Les graines ont ensuite été mises à germer dans les tubes PCR contenant un milieu Hoagland solide stérile (étape 4) puis placés dans une boîte de cônes (boîte de 1 mL) contenant de l'eau distillée avant d'être disposé dans la chambre de culture thermostatée (température de 22°C, humidité relative de 70 %, cycles de photopériode de 8h de jour (de 8h à 16h) et de 16h d'obscurité (de 16h à 8h) sous une intensité lumineuse de 150 µmole de photons.$m^{-2}$.$sec^{-1}$. L'eau contenue dans la boite de cône limite la dessiccation des graines et du milieu solide. *N. B.* : le matériel nécessaire à la réalisation de cette expérience est listé en tableau A8.

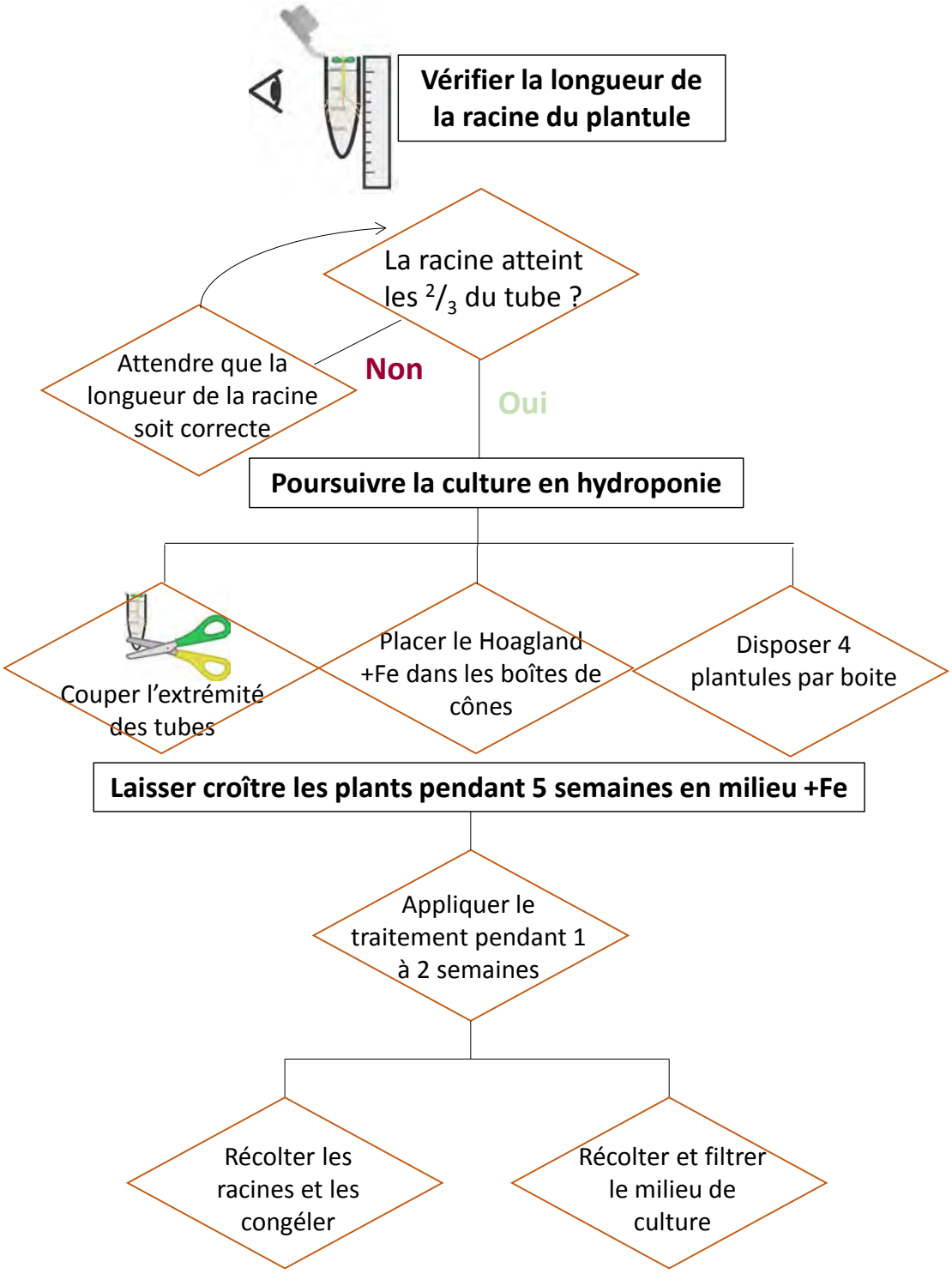



**Figure A3 : Logigramme présentant les étapes clés de la poursuite de la culture en hydroponie.**
Après germination des graines (entre J+7 et J+10) dans des microtubes, la longueur des racines des plantules obtenues est inspectée. Lorsque celle-ci atteint les 2/3 du tube, soit environ 1,4 cm, l'extrémité des tubes est coupée. Les tubes sont alors placés sur le portoir de boites de cônes et mis en contact avec 250 mL de milieu Hoagland complémenté par 25 µM de fer ($Fe^{3+}$-EDTA). Les plantes sont alors cultivées en hydroponie pendant 5 semaines. Quelques plantes sont alors prélevées puis placées dans de nouvelles boites contenant du milieu de Hoagland non additionné de fer afin d'induire une carence. Les cultures sur milieux carencé et non carencé sont alors poursuivies pour 2 semaines supplémentaires.

**Tableau A9 : Identification des gènes codant les protéines GSTUs d'*A. thaliana* d'intérêt.**
Pour chaque protéine étudiée, le code AGI (Arabidopsis Genome Initiative) disponible sur la plateforme TAIR (www.arabidopsis.org) du gène correspondant, est indiqué.

| Protéine | Code AGI |
|---|---|
| **AtGSTU1** | At2g29490 |
| **AtGSTU6** | At2g29440 |
| **AtGSTU7** | At2g29420 |
| **AtGSTU8** | At3g09270 |
| **AtGSTU16** | At1g59700 |
| **AtGSTU19** | At1g78380 |
| **AtGSTU22** | At1g78340 |
| **AtGSTU24** | At1g17170 |
| **AtGSTU25** | At1g17180 |

**Tableau A10 : Liste des molécules utilisées au cours des tests de dénaturation thermique par fluorescence.**
Les tests de thermostabilité ont été réalisés contre cinquante-quatre molécules dont cinquante font partie de la famille des furocoumarines (gras) ou des coumarines (rouge).

| | | |
|---|---|---|
| 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène | **Cnidicine** | **Isobergaptol** |
| 4-hydroxyherniarine | **Cnidiline** | **Isoimpératorine** |
| **5-Hydroxyxanthotoxine** | Coumarine | **Isopimpinelline** |
| **6,7-dihydroxy-bergamottine** | Daphnétine | Isoscopolétine |
| **6-Isopenténylоxyisobergaptène** | Daphnétine diméthyléther | **Lanatine** |
| 6-Isoprényloxy-7-méthoxycoumarine | Daphnétine-7-méthyléther | Limettine |
| 6-Méthoxycoumarine | Déméthylsubérosine | Ombelliférone |
| 7-Méthoxycoumarine | Disulfure de glutathion | Osthol |
| **8-Hydroxy-bergaptène** | Epoxyauraptène | **Oxypeucédanine** |
| Acide férulique | **Epoxy-bergamottine** | **Phelloptérine** |
| **Angélicine** | Esculétine | **Pimpinelline** |
| Auraptène | Esculine | **Psoralen** |
| **Ayapine** | Fraxétine | Scoparone |
| **Bergamottine** | Glutathion réduit | Scopolétine |
| **Bergaptène** | **Héraclénine** | **Sphondine** |
| **Bergaptol** | **Héraclénol** | **Sphondinol** |
| **Byakangélicine** | **Impératorine** | **Xanthotoxine** |
| **Byakangélicol** | **Isobergaptène** | **Xanthotoxol** |

**Tableau A11 : Paramétrage des programmes utilisés lors de l'extraction à chaud (Soxtherm®).**
La température d'extraction correspond à environ 2 fois la température d'ébullition du solvant. L'appareil de Soxtherm® a été paramétré selon les recommandations du fournisseur.

| Paramètres | **Dichlorométhane (DCM1)** | **Acétone (A1)** | **Toluène/éthanol (Toluene/EtOH)** | **Eau (Eau)** |
|---|---|---|---|---|
| Température d'extraction | 80°C | 120°C | 180°C | 191°C |
| Intervalle d'abaissement | 3 minutes | 3 minutes | 3 minutes | 3 minutes |
| Impulsion d'extraction | 2 secondes | 2 secondes | 2 secondes | 2 secondes |
| Phase d'ébullition | 10 minutes | 10 minutes | 10 minutes | 10 minutes |
| Distillation A | 4x | 4x | 4x | 4x |
| Durée d'extraction | 1h20 | 1h20 | 1h20 | 1h20 |
| Distillation B | 4x | 4x | 4x | 4x |
| Distillation C | 5 minutes | 5 minutes | 5 minutes | 5 minutes |
| Durée du programme | 1h59 | 1h59 | 1h59 | 1h59 |

**Résumé :** Les glutathion transférases (GSTs) constituent une famille multigénique d'enzymes ubiquitaires impliquées notamment dans la détoxication des xénobiotiques et le métabolisme secondaire. Les GSTs canoniques sont constituées d'un domaine N-terminal de type thiorédoxine et d'un domaine C-terminal formé d'hélices α. Chez les plantes terrestres, les GSTs peuvent être regroupées en 14 classes et selon le résidu conservé au sein de leur motif catalytique en GSTs à cystéine (Cys-GSTs) ou à sérine (Ser-GSTs). Les Ser-GSTs présentent des activités de réduction des peroxydes et/ou de conjugaison de glutathion (GSH) alors que les Cys-GSTs portent des activités de déglutathionylation et déshydroascorbate réductase. Certaines d'entre elles présentent également des propriétés non-catalytiques de type ligandine à des fins de transport ou de stockage de molécules diverses. Les GSTs Tau (GSTUs) correspondent à la classe regroupant le plus d'isoformes chez les plantes et leur sont spécifiques. Les GSTUs sont souvent surexprimées lors de stress biotiques et abiotiques et participent notamment à la détoxication des herbicides. Toutefois, le rôle physiologique des GSTUs reste encore lacunaire *in planta*. En combinant des approches phylogénétiques, biochimiques et structurales, ces travaux ont conduit à la caractérisation de neuf GSTUs d'*Arabidopsis thaliana* (AtGSTUs) et de six GSTUs de *Populus trichocarpa* (PtGSTUs). L'analyse phylogénétique des Ser-GSTs d'organismes photosynthétiques a révélé que l'expansion des GSTUs est apparue de façon concomitante à l'apparition du réseau vasculaire chez les plantes bien que quelques mousses et bryophytes possèdent des GSTUs. Au sein d'un organisme, les GSTUs peuvent être classées en groupes distincts en fonction de leur motif catalytique. Les essais enzymatiques réalisés ont montré que quasiment toutes les GSTUs d'intérêt portent des activités de conjugaison du GSH et de réduction des peroxydes envers différents substrats modèles (CDNB, dérivés d'isothiocyanates, hydroperoxydes). Les structures tridimensionnelles de deux GSTUs ont été résolues et ces dernières présentent le repliement classique des GSTs canoniques avec des différences notables entre elles. Les analyses biochimiques et structurales réalisées sur les protéines AtGSTUs et PtGSTUs d'intérêt ont montré que certaines d'entre elles lient des porphyrines bactériennes et d'autres des composés polyphénoliques. Parmi les complexes enzyme-ligand identifiés, la structure d'un complexe baicaléine-GSTU a été résolue. L'utilisation d'échantillons enrichis en métabolites extraits de plantes représente la prochaine étape sur le chemin de l'analyse fonctionnelle des GSTUs.

**Mots-clés :** glutathion transférase, *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, GST Tau, cinétique enzymatique, structure cristallographique, recherche de ligands/substrats

**Abstract:** Glutathione transferases (GSTs) constitute a ubiquitous multigene superfamily of enzymes involved in xenobiotic detoxification and secondary metabolism. Canonical GSTs consist of an N-terminal thioredoxin domain and a α-helical C-terminal domain. In terrestrial plants, GSTs can be grouped in 14 classes but also according to the conserved residue found in their catalytic site either cysteine (Cys-GSTs) or serine (Ser-GSTs) GSTs. Ser-GSTs exhibit reduction of peroxides and/or glutathione (GSH) conjugation activities while Cys-GSTs rather exhibit deglutathionylation and dehydroascorbate reductase activities. Some of them also appear to have non-catalytic ligandin properties for the transport or storage of various molecules. The plant-specific Tau GST (GSTU) class is usually the most expanded one. The GSTUs are often over-expressed during biotic and abiotic stresses contributing notably to herbicide detoxification. However, the physiological role of most GSTUs is still poorly documented *in planta*. By combining phylogenetic, biochemical and structural approaches, this work led to the characterisation of nine GSTUs from *Arabidopsis thaliana* (AtGSTUs) and six GSTUs from *Populus trichocarpa* (PtGSTUs). Phylogenetic analysis of the Ser-GSTs present in photosynthetic organisms revealed that the expansion of GSTUs occurred concomitantly with the appearance of vasculature in plants, although some mosses and bryophytes possess GSTUs. Within an organism, GSTUs can be classified into distinct groups according to their catalytic motif. Enzymatic tests using recombinant proteins showed that almost all studied GSTUs exhibit GSH conjugation and peroxide reduction activities against different model substrates (CDNB, isothiocyanate derivatives, hydroperoxides). The three-dimensional structures of two GSTUs have been resolved and these adopt the classical canonical GST fold with some notable difference between them. The biochemical and structural analyses of these AtGSTUs and PtGSTUs further showed that some of them bind bacterial porphyrins while others bind polyphenolic compounds. Among the enzyme-ligand complexes identified, the structure of a bacalein-GSTU has been solved. The use of metabolites enriched samples extracted from *A. thaliana* and *P. trichocarpa* is the next step to decipher the role of GSTUs *in planta*.

**Keywords:** glutathione transferase, *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, Tau class, enzymatic assays, 3D crystal structure, ligand/substrate identification