Université de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition

Présentée et soutenue par :
Abderrakib ZAHID

le : vendredi 16 juillet 2010

Titre :

Mécanismes cellulaires et moléculaires régissant le métabolisme des semences de céréales : Rôle du réseau rédoxines- Système antioxydant dans la prédiction de la qualité germinative

---

JURY

Pr. Ahmed Lebrihi, Directeur de l'ENSAT, Toulouse, Président
Pr. Jean Daydé, Directeur de la recherche à l'EIP, Toulouse, Examinateur
Dr. Françoise Montrichard, Maître de conférences, Université d'Angers, Examinateur
Dr Roland Cazalis, Enseignant-Chercheur à l'EIP, Toulouse, Examinateur

---

Ecole doctorale :
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :
Laboratoire d'Agrophysiologie de L'Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Toulouse

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Roland Cazalis

Rapporteurs :
Dr. Frédéric Gaymard, Directeur de recherche INRA, Montpellier
Dr. Jean Philippe Reichheld, Chargé de recherche CNRS, Perpignon

A la mémoire de ma Grande Mère et de mon Père

A ma Mère

A mes frères et sœurs

A toute ma famille

Que ce travail soit le leur

Remerciements

Bien que cette page soit très ordinaire, elle a pourtant une importance capitale. A titre personnel, je suis heureux d'avoir l'occasion ici d'exprimer ma gratitude vis-à-vis de personnes qui ont eu un rôle réel ou relatif à ma thèse. J'espère que les mots que je m'apprête à écrire réussiront à retranscrire fidèlement mes sentiments à leur égard.

Les recherches qui font l'objet de cette thèse ont été menées au sein du Laboratoire d'Agro-Physiologie de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan (EIP), dirigé par le Professeur Vassilia Thiodorou-Bayle.

Mes premiers remerciements vont à Mme Vassilia Thiodorou-Bayle, professeur à l'EIP pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je la remercie aussi pour son soutien tout au long de ma thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Mr Roland Cazalis, Enseignant-Chercheur à l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan et Directeur de thèse. Il a su me faire bénéficier de son expérience. Je le remercie pour son suivi tout au long de cette thèse, et pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée en m'accordant une grande autonomie.

***Aux membres du jury :** Mr Ahmed Lebrihi, président du jury de cette thèse, Professeur et Directeur de l'Ecole National Supérieure Agronomique de Toulouse. Qu'il soit ici remercié pour avoir accepté cette tâche et pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.*

Je remercie également Mr Frédéric Gaymard, Directeur de recherche à l'INRA de Montpellier et Mr Jean Philippe Reichhled, Chargé de recherche au CNRS à Perpignon d'avior bien voulu examiner ce travail de recherche en qualité de rapporteurs et de l'honneur qu'il m'ont fait en participant à ce jury.

Je remercie Mme Françoise Montrichard, Maître de conférences à l'université d'Angers et Mr Jean Daydé, Directeur de la recherche à l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan, d'avoir bien voulu examiner cette thèse en qualité d'examinateurs.

***Aux membres du comité de pilotage de la thèse** : Mme Florence Vignols et Mr Ahmed Lebrihi pour leur présence et pour l'aide qu'ils m'ont apporté à travers des discussions que nous avons eu pendant les réunions de comité de pilotage de la thèse.*

***A la direction de l'EIP** : Un grand merci au membre de direction de l'école d'ingénieurs de purpan. Mr Michel Roux, directeur général. Mme Viviane Sassus, directeur financié. Mme Françoise Fraysse, reponsable de personnel. Je les remercie pour le soutien financié. Je remercie également Latifa Sounni et Khadija El ouasqui pour leur symphatie et leur intérêt pour la réussite de cette thèse. Mes remerciements vont à tous le personnel de l'EIP que j'ai côtoyé tous les jours.*

Au conseil régional de Midi-pyrénées *: d'avoir soutenu ce projet de recherche. Grâce a sa contribution financière, ce projet a pu voir le jour.*

Je tiens également à remercier :

Aux stagiaires: Benoit Strauss éléve ingénieur de l'EIP d'avoir contribué à la réussite de ce travail. Samia Afoulous pour son implication dans la mise en place des travaux d'inteférence ADN.

A tous les membres du laboratoire d'Agrophysiologie de l'EI Purpan: Mesdames Anne Calmon, Monique Berger, Cécile Levasseur, Nathalie Mailhac, Messieurs Frédéric Violleau et Olivier Surel. A Alban Jacques, depuis son arrivée, il a contribué à la réussite de ce travail, je le remercie tout particuliérement.

A Mireille Gaucher, à qui j'exprime mes profonds remerciements pour, son amitié, sa gentillesse et sa disponibilité. Merci à Christel Couderc, Cheryl Arkhat et Céline Arliguie pour leur sympathie et leur joie de vivre.

Ma sympathie et ma profonde amitié vont à mes collègues Thésards, Marie-Pierre Artigot, Khalid Rbii, Marc Bourgin et Jérôme pouzoulet, pour leur gentillesse, leur humour et leur joie de vivre.

Les travaux présentés dans cette thèse ont donné lieu aux publications, communications et posters suivants:

Articles, Proceeding et Chapitre de livre:

- **Zahid. A, Gabarrou. J.F Cazalis. R**. Reducing and Cross-Linking wheat seed storage proteine with thioredoxin h". 2007.. R. Proceeding, Consumer Driven Cereal innovation. *ISBN* 978-1-891127-61-8.
- **Zahid. A and Cazalis. R.** Interaction of thioredoxin h with Maize endosperm protein fractions", *In* Plantas C4 y CAM, Ed. J. L. Gonzalez Rebollar, Editorial: Servicio de Publicaciones del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) con la colaboración de la Fundación.
- **Zahid. A, Afoulous. S and Cazalis. R**. Thioredoxin h system and wheat seed quality. Cereal Chemistry. 2008, 85 (6):799-807.
- **Zahid. A, Traverso. JA, Gabarrou. JF and Cazalis. R.** Implication of Trx h in formation of high molecular weight protein. Cereal chemistry (Soumis).
- **Zahid. A, Travesro. J.O and Cazalis. R**. Efficient transformation of cereal mediated by Agrobacterium. Plant Cell Reports (Soumis).
- **Zahid A, Traverso, J.A Cejudo FJ, and Cazalis R**. Redoxin gene expression pattern of wheat seed at the early stage of germination. Journal of Experimental Botany (En préparation).

Communications orales ou affichées

- **Zahid, A, Gabarrou, J.F and Cazalis, R**. Reducing and Cross-linking wheat seed storage proteins with thioredoxin *h*" C&E Spring Meeting, Consumer Driven Cereals Innovation: Where Science Meets Industry, Montpellier, France, 2-4 Mai 2007.
- **Zahid, R and Cazalis, R.** Thiol protein expression during germination and biological quality of wheat seed" International symposium Glutathion and related thiols in microorganisms and plants. Nancy, France, 26-29 Août 2008.
- **Zahid, A and Cazalis, R.** Looking for a physiological critical point during germination of wheat seed under water stress conditions" Environment Workshops Plant Biomass for Food and Energy: Future and Reality. Baeza, Spain, 9-11 Octobre 2008.

- **Zahid, A and Cazalis, R.** Méthode simplifiée de transformation du blé via Agrobacterium tumefaciens", 2ème colloque national du réseau français de biologie des graines, Graines 2009, Paris. France, 4-5 Juin 2009.
- **Zahid, A, Peton, A, Pagano, E, Violleau, F and Cazalis, R**. Seed germination and ROS production in cereal", GDR Redoxins meeting, Redoxins 2009, Perpignan, France, 19-21 Août 2009.

Liste des abbreviations

APX: Ascorbate peroxydase

CAT: Catalase

DICER: (RNA Interference Key Enzyme)

DTT: Dithiotreithol

FAD: Flavine Adénine Dinucléiotide

FTR: Ferredoxine Thioredoxine Réductase

GeADN: gène entier d'ADN

GR: Glutathion réductase

GRX: Glutaredoxine

GSH: Glutathion réduit

GSSG: Glutathion oxydé

LTP-1: Lipid Transfer Protein-1

mBBr: Monobromobimane

NTR: NADPH Thioredoxine Réductase

NTS: NADPH Thioredoxine Système

PCD: Programmed Cell Death

PDI: Protien Disulfide isomèrase

PER ou PRX: Peroxyrédoxine

POX: Peroxydase non-spécifique

PR.1.1: Pathogenesis Related

RISC: RNA-induced Silencing Complex

RNAi: RNA Interference

ROS: Espèce réactives de l'oxygène

SDS-PAGE: Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en milieu SDS

SG-HPM: Sous-unité gluténique de Haut poids moléculaire

SG-FPM: Sous-unité Gluténique de Faible poids moléculaire

SiADN: Séquence interfering DNA

SOD: Superoxyde dismutase

TIGR: The Institute For Genomic Research

TRX: Thioredoxine

WDEIA: Wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis

Partie I

Sommaire

Sommaire 7

Introduction générale 12

1 Structure de la plante et protéines du grain de blé 17

1.1 Physiologie 17

1.2 Protéines de réserve du blé tendre 18

1.3 L'amidon du blé 20

1.4 Qualité germinative du blé tendre 21

2 Implication des rédoxines dans les phénomènes de régulation . 22

2.1 Thiorédoxines 23

2.1.1 Le système thiorédoxine *h* 24

2.1.2 Rôles des thiorédoxines *h* 27

2.1.3 Thiorédoxines chloroplastiques 30

2.1.4 Thiorédoxines *f* et *m* dans les tissus non photosynthétiques 32

2.2 Glutarédoxines 34

2.2.1 Glutarédoxines : fonctions et cibles 35

2.2.2 Les GRL (Glutaredoxine Like Protéine) 36

2.3 Peroxyrédoxines 37

2.3.1 Classification 37

2.3.2 Fonctions des peroxyrédoxines dans les plantes 39

2.4 Les éléments du système antioxydant 40

2.4.1 Superoxyde dismutase (SOD) 41

2.4.2 Ascorbate peroxydase (APX) 41

2.4.3 Catalase (CAT) 42

2.4.4 Glutathion (GSH) 43

2.4.5 Glutathion réductase (GR) et peroxydase non-spécifique (POX) 44

2.5 L'allergénicité des protéines de réserve 45

Objectif *48*

Résultats *61*

CRIBLAGE DES REDOXINES DU BLE *62*

1 Matériels et méthodes *63*

1.1 Criblage de banque EST du blé **63**

1.2 Criblage de l'ADNc Soissons **64**

2 Résultats et discussion *64*

2.1 Résultats des recherches de Trx h dans les banques EST **64**

2.2 Comparaison de la Trx h4 avec la Trx h2 standard. **67**

2.3 Résultats des recherches de Grx dans les banques EST **70**

2.4 Résultats des recherches de Prx dans les banques EST **73**

2.5 Expression des protéines recombinantes **73**

2.5.1 Matériels et méthodes 73

2.5.2 Résultats 74

INTERACTIONS TRX H-PROTEINES DE RESERVE DU BLE (CV SOISSONS) *77*

REDUCING AND CROSS-LINKING WHEAT SEED STORAGE PROTEINS WITH THIOREDOXIN H **79**

EFFET D'UN ELICITEUR SUR L'EXPRESSION DES MARQUEURS DU SYSTEME MODELE LORS DES PREMIERES PHASES DE LA GERMINATION DU BLE *87*

3 Matériels et méthodes *90*

3.1 Matériel biologique 90

3.2 Extraction d'ARN et analyses par QRT-PCR 90

3.3 Analyse par Western blot 91

3.4 Dosage des activités enzymatiques 92

4 Résultats 92

4.1 Etudes de la Peroxyredoxine-1 (1-Cys-Prx) 92

5 Expression des marqueurs 97

5.1 Taux de germination 97

5.2 Suivi de l'expression de la 1-Cys-Prx 98

5.3 Suivi de l'expression des Trxs h 100

5.4 Expression de marqueurs de stress biotique 100

5.5 Activités enzymatiques de la Catalase et l'Ascorbate peroxydase 101

6 Discussion 102

MODULATION IN PLANTA DE L'EXPRESSION DES REDOXINES 109

MODULATION DES REDOXINES PAR INTERFERENCES ADN 111

1 Matériels et méthodes 113

1.1 Préparation de l'ADN interférant 113

1.1.1 Gènes de thiorédoxines et de glutarédoxines 113

1.1.2 Les petites ADN double brin (SiADN) 114

1.2 Matière végétale 115

1.3 La quantification relative de l'expression génique par PCR en temps réel 116

1.4 Analyse par western blot 117

2 Résultats 117

2.1 L'expression des gènes 117

2.1.1 Inhibition par Trx h1 118

2.1.2 Inhibition par Trx h2 120

2.1.3 Inhibition par Grx 121

2.2 Expression des proteins des Trx hs 123

2.1 Analyse phénotypique 124

3 Discussions 125

METHODE SIMPLIFIEE DE TRANSFORMATION DES CEREALES PAR AGRBACTERIUM TUMEFACIENS 129

Discussion générale 171

Conclusion générale et perspective 180

ANNEXE 1: INTERACTION OF THIOREDOXINS H WITH MAIZE ENDOSPERM PROTEIN FRACTIONS 183

Références bibliographiques 196

Partie II

Introduction générale

La première décennie du 21ème siècle est marquée par d'importants changements qui se répercutent sur les structures des marchés agricoles. Le développement massif et rapide des économies émergeantes engendre une augmentation de leur consommation de viande et de produits laitiers, alimentation cinq fois plus coûteuse en énergie que la consommation de produits végétaux. Ce facteur couplé à la demande croissante des bio-carburants et à la croissance démographique, engendre une augmentation de la demande mondiale de céréales. Ceci entraine une baisse conséquente des stocks mondiaux et une flambée des prix qui atteignent des niveaux records. Bien que nettement inférieurs aux niveaux records de juin 2008, les prix des produits alimentaires restent élevés en 2009 par rapport aux tendances des 10 dernières années. Les projections de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) et de la FAO indiquent que les prix des denrées alimentaires se maintiendront à ces niveaux, voire augmenteront à moyen terme, continuant ainsi à dépasser en termes réels les niveaux antérieurs aux flambées de 2007-08 (OCDEFAO. 2009). Une première analyse (en avril 2009) des données a confirmé que les prix sur le marché intérieur des pays en développement sont restés globalement très élevés, bien que les prix sur le marché international aient considérablement reculé par rapport à 2008.

La situation des prix de céréales sur le marché intérieur des pays en voie de développement reste élevée. S'agissant du blé et de ses produits dérivés, 71 % des pays de l'Afrique subsaharienne étudiés ont enregistré des prix plus élevés. Les prix des aliments demeurent également élevés dans d'autres régions, notamment ceux du riz en Asie et du maïs et du blé en Amérique centrale et du Sud.

À moyen terme, les estimations OCDEFAO (2009) indiquent que la croissance de la production agricole pendant les 10 prochaines années n'égalera pas celle de la décennie écoulée, la croissance annuelle moyenne passant de 2 % en 1999-2008 à 1,7 % en 2009-2018. En conséquence, les taux de croissance par habitant devraient être identiques (soit 0,6 %).

L'ensemble de ces données, laissent anticiper un changement structurel durable du marché. Dans ce contexte, le blé, une des céréales la plus produite dans le monde avec 610 Mt en 2007 (FAOSTAT), est un produit extrêmement stratégique.

Le blé a toujours occupé une place primordiale dans l'alimentation mondiale, environ les trois quarts de la production sont destinés à la consommation humaine. A cause de l'augmentation croissante de la demande mondiale pour ce produit, les producteurs de

céréales se font forts de répondre à des exigences des consommateurs ainsi qu'à celle de la compétitivité.

La qualité technologique du blé tendre (*Triticum aestivum*) est à l'heure actuelle une des principales préoccupations. Ainsi, les variations des qualités technologiques des récoltes, liées particulièrement aux taux de protéines, peut pénaliser leurs valorisations à l'exploitation.

Toutefois, la qualité est un atout majeur pour répondre aux défis posés par l'intensification de la concurrence. La qualité est un concept multiforme en totale évolution depuis quelques années pour les productions agricoles végétales, notamment pour les céréales comme le blé tendre. La satisfaction des besoins des utilisateurs constitue le premier signe de la qualité mis en avant lors de la transformation des matières premières agricoles. Elle se fonde sur la définition d'un ensemble de propriétés ou critères désirés par l'ensemble de la filière.

La qualité technologique permet avant tout d'avoir une bonne satisfaction de l'industrie agroalimentaire. Elle dépend essentiellement des protéines de réserve, les prolamines, groupe englobant les gliadines et les gluténines. En effet, ces protéines sont déterminantes pour conférer au gluten la capacité de former un réseau viscoélastique au cours des processus technologiques. Les gliadines sont responsables de la viscosité du réseau alors que les gluténines sont davantage responsables de son élasticité. En France une enquête a été réalisée en 2007 pour déterminer les teneurs des récoltes en protéines. Généralement, une teneur en protéines supérieure à 13 % MS est suffisante pour valoriser les blés panifiables, alors qu'elle est de l'ordre de 12,4 % MS pour les blés non panifiables (BAU) (ONIGC-Arvalis/Enquête au champ 2007). Dans ce contexte, le commerce des blés évolue vers une segmentation des demandes sous les contraintes à la fois de la multiplication des produits finis offerts aux consommateurs, ainsi que du développement des procédés de transformation qui ne cessent d'être modifiés. Cela ne va pas sans poser des problèmes d'adaptation de la production des matières premières.

La plupart des études ont porté sur la qualité selon donc des critères favorables à l'industrie agroalimentaire. Cette approche est très incomplète puisqu'elle ne tient pas compte des propriétés germinatives du blé. Celle-ci englobe la résistance à la dessiccation, la capacité de mise en dormance métabolique et la vitesse de germination plus au moins rapide. Ces propriétés sont déterminantes pour les semenciers, car elles permettent d'améliorer la maîtrise des cultures et de comprendre l'adaptation des différentes variétés aux diverses conditions

climatiques. Cette étude est également d'actualité, si l'on considère le besoin pressant de comprendre le comportement des céréales face aux changements climatiques, aux augmentations de température et aux stress qui en découlent.

Par exemple, l'élévation de la température a entraîné un avancement moyen d'une semaine du stade épi à 1 cm et de l'épiaison du blé (étapes clés de son processus de développement) depuis la période 1955-1980. Les dates de récolte sont plus précoces d'un peu moins de 10 jours, depuis cette même période. Ces chiffres sont plus importants pour les variétés moins exigeantes en durée de photopériode et de vernalisation.

Face à l'évolution des conditions climatiques, diverses solutions sont mises en avant pour y faire face. On distingue principalement deux stratégies, la première étant d'esquiver les conditions climatiques défavorables. Une utilisation de variétés plus précoces de blé permet d'avancer son épiaison et ainsi d'éviter de combiner les phases délicates de sa croissance avec les conditions climatiques défavorables du printemps. Cette stratégie est à équilibrer avec les risques associés à une précocité trop importante, comme le gel des épis, l'attaque de pucerons à l'automne, ou encore l'augmentation de l'infestation des mauvaises herbes. Il se dessine un profil variétal de blé bien adapté au changement climatique: une variété suffisamment précoce à l'épiaison mais trop précoce au stade épi à 1 cm. Des variétés avec un tel profil sont assez rares, mais des stratégies de sélection peuvent être adaptées pour les développer et les multiplier.

L'autre stratégie consiste à augmenter la tolérance des variétés aux changements. Des expérimentations sur variétés, soumises à différentes conditions de stress hydrique, apportent des conclusions intéressantes. Des expérimentations similaires portent sur la tolérance du grain face à la canicule et aux carences en azote liées à un manque de pluie (Gate, 2007).

Les modifications génétiques développées dans les années 80 constituent une alternative stratégique. Elles ont permis de produire des plants de céréales, capables de résister à des conditions climatiques défavorables, ou encore des plantes avec des valeurs nutritives améliorées.

Il est clair que la connaissance de la physiologie et de la qualité germinative des céréales en général, serait un moyen d'améliorer et de développer de nouvelles variétés capables de résister au stress par exemple lié au manque d'eau ou à la sécheresse afin de répondre à la demande mondiale croissante.

Notre étude s'inscrit dans ce sens. Pour avancer dans la compréhension de la physiologie de la semence, nous avons utilisé le blé « Soissons » comme cultivar modèle, encore présent dans les assolements français depuis une vingtaine d'années. En dépit du fait qu'il n'occupe plus que quelques pourcentages des surfaces en France, il reste cependant très présent, principalement en Auvergne. Le «Soissons de Limagne», avec ses teneurs en protéines élevées et son comportement proche d'un blé améliorant conserve un marché qui lui est propre. Son point faible est sa sensibilité à la rouille brune et à la fusariose.

1 Structure de la plante et protéines du grain de blé

1.1 *Physiologie*

Le blé correspond à la sous espèce *Triticum aestivum vulgare,* et se présente sous diverses formes et variétés. La plante adulte possède un brin maître et une ou deux talles. Chaque tige se termine par des épis blancs, parfois roux, portant 12 à 15 épillets chacun (Figure 1). Chaque épillet contient 2 ou 3 fleurs fertiles capables de s'autoféconder, entraînant ainsi la formation d'un grain.

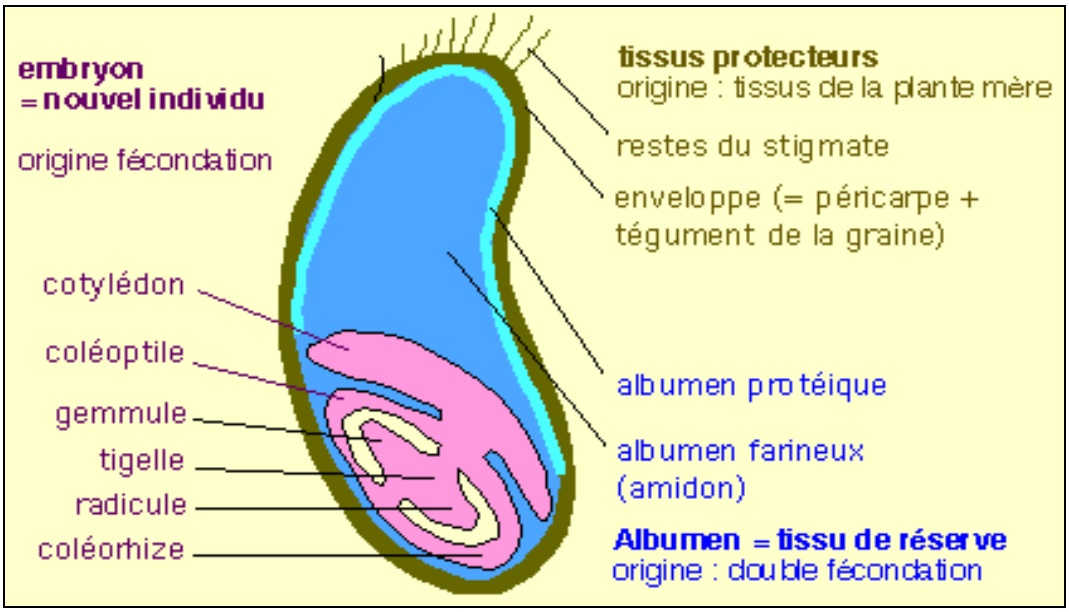


Figure 1 : Schéma d'un grain de blé (Mossiniak, 2006).

Le grain de blé tendre est un caryopse nu, blanc ou roux, ovoïde et pesant 35 à 45 mg. Il est composé d'un embryon correspondant à un nouvel individu et d'un albumen dont la fonction est d'être un tissu de réserve. La graine est entourée de tissus protecteurs permettant de conserver l'embryon et l'albumen, jusqu'à ce que les conditions environnementales permettent la germination. La Figure 2 ci-contre illustre en détail la composition du grain de blé (Monsiniak, 2006).

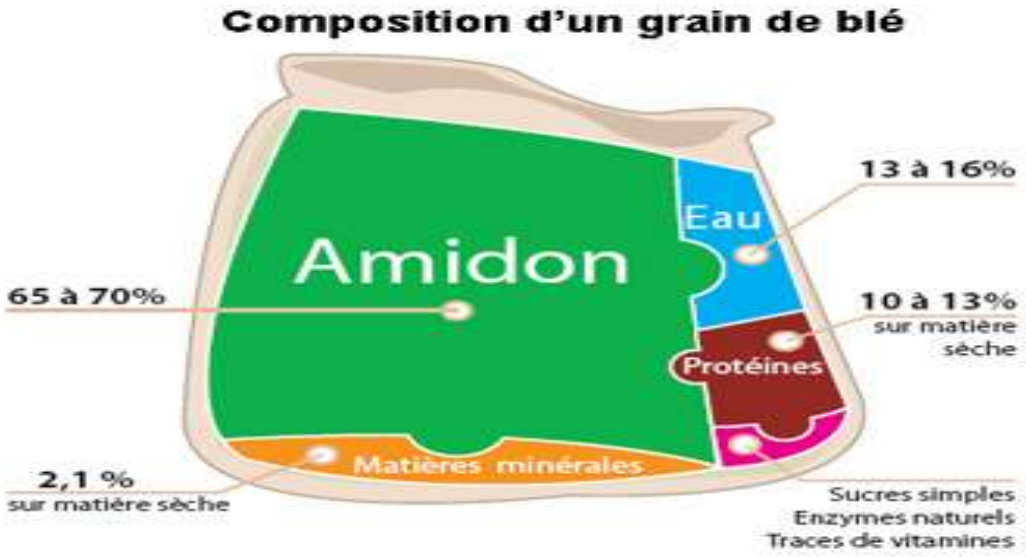


Figure 2 : Composition d'un grain de blé (www. Boulangerie.net).

1.2 *Protéines de réserve du blé tendre*

L'albumen du grain du blé tendre (ou amande) représente 84 % du poids de la graine, en moyenne. Cet albumen est farineux et se compose en moyenne de 76 % d'amidon, de 14 % de protéines et de 2% de lipides (Figure 2). Les protéines ne sont pas réparties de façon uniforme dans le grain, un gradient naturel de distribution au sein du grain peut être mis en évidence. Ainsi, le rapport amidon/protéines augmente de façon significative des régions périphériques aux régions centrales du grain. La couche à aleurone est constituée de 30 à 35% des protéines. De même, le germe en comporte 35 à 40% alors que le péricarpe, tout comme le centre de l'albumen ne contiennent que 6 à 9% de protéines seulement. Mais globalement, et compte tenu de l'importance pondérale relative de ces différents tissus, 70 à 80% des protéines se trouvent dans l'albumen.

Les protéines des grains peuvent être classées en trois groupes selon leur fonction. On citera ainsi les protéines structurelles, les protéines fonctionnelles, et enfin les protéines de réserve. Le système de classification des protéines de céréales repose toujours en grande partie sur les travaux historiques d'Osborne, en 1907, qui exploita les différences de solubilité des protéines dans une séquence de solvants. Il avait ainsi défini quatre grandes fractions protéiques (Tableau 1).

	Osborne (1907)		Shewry *et al.* (1986)		Singh et Shepherd (1988)	
Groupes	Solubilité	PM (kDa)	Composition	Structure	Localisation des gènes	Fonction
Albumines Globulines	Eau Sels neutres	5 à 90				Protéines de structure et fonctionnelles
Gliadines	Alcools dilués	25 à 75		Monomèriques		
- ω			Pauvres en S		*Gli-1* (1A,1B, 1D) C	
- α					*Gli-2* (6A,6B, 6D) C	
- β					*Gli-2* (6A, 6B, 6D) C	Protéines de réserve ou Prolamines
- γ			Riches en S		*Gli-1* (1A, 1B, 1D) C	
Gluténines - FPM - HPM	Acides, bases réducteurs, détergents	100 à plusieurs milliers		Agrégées ou polymérisées	*Glu-3* (1A,1B, 1D) C *Glu-1* (1A,1B, 1D) L	

Tableau 1 : Classification des protéines de grain de blé d'après différents auteurs (Osborne, 1907, Shewry et al., 1987, Singh et Shepherd, 1988) en fonction de différents critères de solubilités, masse moléculaire, composition en soufre, structure, localisation sur les gènes et propriétés fonctionnelles.

Les albumines, solubles dans l'eau et les globulines, solubles dans des solutions salines diluées, souvent regroupées sous le terme de protéines solubles ou d'albumines-globuline; les gliadines, solubles dans les alcools dilués (éthanol à 70%); les gluténines, protéines résiduelles partiellement solubles dans les acides et les bases dilués.

Ces dernières sont solubilisées de manière quasi exhaustive par des détergents ou en ajoutant des réducteurs (β-mercaptoéthanol) aux solvants précédents.

Les albumines et globulines (15 à 20% des protéines de la farine) rassemblent de nombreuses protéines possédant des propriétés physicochimiques (masse moléculaire comprise entre 5 et 90 kDa, composition en acides aminés, pH isoélectrique) et fonctionnelles (activités enzymatiques : alpha et beta-amylase, protéases, oxydoréductases, inhibiteurs d'enzymes, pouvoir émulsifiant) très diverses. Les gliadines et gluténines, principaux composants du gluten, constituent « les protéines de réserve » de l'albumen.

Les gliadines représentent approximativement 30 à 40% des protéines de la farine, et environ 45% des protéines de réserve. Ce sont des protéines monomériques solubles dans les alcools aqueux (propanol 70%). Elles ne peuvent s'associer que par la mise en jeu de liaisons faibles (hydrogène, hydrophobes). On distingue 4 classes de gliadines en fonction de leur mobilité éléctrophorétique croissante en Acide-PAGE.

Les α/β et γ-gliadines ont des masses moléculaires estimées en milieu SDS par SDS-PAGE comprises entre 30 et 40 kDa, et entre 60 et 80 kDa pour les ω-gliadines. Les α/β, les γ et les ω-gliadines représentent respectivement 44-80%, 30-46% et 6-20% des gliadines totales (Wieser et al. 1994). Cependant, il a été montré que l'analyse en milieu SDS surestime les masses moléculaires (Bunce et al.,1985) et des analyses en spectrométrie de masse ou les déductions de masses en relation avec les séquences ont permis d'obtenir des valeurs beaucoup plus proches de la réalité. Ainsi, les α/β gliadines et les γ-gliadines sont caractérisées respectivement par des masses de l'ordre de 28 à 35 kDa, et de 31 à 38 kDa.

Les gluténines totales représentent entre 40 à 50% des protéines de la farine. Ce sont des protéines de type polymériques et agrégées, formant un matériel beaucoup plus complexe que les gliadines. Elles sont partiellement solubles dans les acides ou les bases dilués, dans des solutions d'urée ou des détergents. Ces gluténines peuvent être séparées en deux classes distinctes, qui sont les gluténines de haut poids moléculaire (SG - HPM), et les sous-unités gluténiques de faible poids moléculaire (SG-FPM). La classe des SG-HPM présente des masses moléculaires qui s'échelonnent en SDS-PAGE entre 100 kDa et 160 kDa (Shewry et al., 1986). Les SG-FPM représentent 60 à 80% des gluténines totales, soit 20 à 30 % des protéines de la farine.

Un grand nombre d'essais de fractionnement et de reconstitution classiques supportés par les premières recherches sur les propriétés des gliadines et des gluténines purifiées ont été entrepris afin de relier le rapport gluténiques/gliadines aux caractéristiques du gluten. Ces différentes études de reconstitution démontrèrent que les propriétés rhéologiques des farines artificielles sont fortement influencées par la teneur relative des différentes fractions protéiques (Lee and MacRitchie, 1971; MacRitchie, 1980). Ainsi, en faisant varier le rapport gluténines/gliadines tout en maintenant le taux de protéines constant, il a été démontré que la force de la farine reconstituée, mesurée par le temps de développement de la pâte au mixographe, était directement en lien avec la proportion de gluténines.

1.3 *L'amidon du blé*

L'amidon (*amylum*, fleur du farine) est un glucide de réserve utilisé par les végétaux supérieurs pour stocker de l'énergie. Il est aussi appelé sucre lent ou complexe. Les granules d'amidon possèdent une cohésion radiale covalente correspondant à l'axe longitudinal des

molécules constitutives et une cohésion tangentielle résultant de la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires qui contribuent à l'agrégation d'un grand nombre de chaînes et donc à la formation de zones cristallines. Celles-ci sont séparées par des régions amorphes inorganisées.

La répartition granulométrique des grains d'amidon est directement liée au rapport amylose/amylopectine de l'amidon. Les granules d'amidon de blé sont en effet des entités semi-cristallines formées principalement de deux types de molécules, l'amylose (en général, 26 à 28%) et l'amylopectine (72 à 74%). Ces deux polymères ont des structures très différentes, l'amylose étant linéaire et l'amylopectine très ramifiée. Les teneurs respectives en amylose et en amylopectine influent sur les propriétés chimiques et technologiques d'un amidon, propriétés telles que sa susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique, ses propriétés gélifiantes et épaississantes, …

Les teneurs en amylose, déterminées par réaction colorimétrique de l'iode avec l'amidon, varient légèrement en fonctions des variétés. L'amylose et l'amylopectine jouent chacune un rôle déterminant dans la fonctionnalité finale de l'amidon naturel et des dérivés: viscosité, résistance au cisaillement, gélatinisation, solubilité, pouvoir adhésif, … Un lien a par exemple été établi entre de faibles teneurs en amylose, une viscosité à chaud élevée, une faible tenue de la viscosité à chaud et un faible pouvoir épaississant à froid de l'amidon de blé.

1.4 *Qualité germinative du blé tendre*

L'étude classique du blé suivant sa qualité technologique permet de satisfaire l'industrie agroalimentaire. Or l'étude du comportement de la céréale au champ est essentielle pour faire face aux défis d'adaptation de la plante aux changements climatiques et à la demande croissante du marché mondial en céréales. La qualité germinative concerne entre autres la capacité du grain à germer plus ou moins rapidement et à résister aux stress environnementaux. La première caractéristique peut avoir une influence directe sur les rendements des cultures par l'augmentation du taux de grain germés lors d'une culture céréalière. La résistance du grain aux stress environnementaux permet de limiter les chutes de rendements induits par des conditions climatiques défavorables. Dans le premier cas, on répond à un besoin d'augmentation des rendements des cultures céréalières, et dans le second

à un besoin d'adaptation des plantes à l'augmentation des températures et des risques de manque d'eau des cultures.

Il peut exister des divergences d'intérêt entre l'amélioration de la qualité germinative d'un blé tendre et des besoins en qualité technologique. En effet, l'indice de Hagberg est un critère de qualité important pour la force boulangère d'un blé. Or, il concerne le taux de grains de blé ayant repris une activité amylasique lors de la récolte. L'augmentation de la vitesse de germination pourrait entraîner une augmentation du taux de grains ayant repris cette activité amylasique, ce qui est défavorable à l'industrie agroalimentaire. Les études portant sur la qualité germinative du blé doivent tenir compte de cette divergence d'intérêt pour leur application.

Pour répondre aux besoins liés à l'amélioration des taux de germination des céréales et à l'amélioration de la résistance des céréales aux contraintes environnementales, l'étude de la qualité germinative des céréales semble le meilleur moyen. Une famille de protéines a fait l'objet de notre étude, il s'agit des rédoxines, dont les mécanismes de régulation, et plus particulièrement pendant les processus de germination, font l'objet de nombreuses recherches.

2 Implication des rédoxines dans les phénomènes de régulation

Les rédoxines sont une famille de protéines fonctionnelles, impliquées dans des réactions d'oxydo-réduction. Elles sont capables de réduire les ponts disulfures des protéines cibles. De nombreuses protéines présentent des cystéines oscillant réversiblement du disulfure au dithiol. Elles sont impliquées dans des phénomènes divers comprenant le métabolisme, la défense contre le stress ainsi que la régulation de la photosynthèse et de la prolifération cellulaire. Chez les plantes, de nombreux gènes de rédoxines ont été identifiés ainsi que de nombreuses protéines cibles. La réduction de ces protéines a pour effet de réguler leur activité (Hogg, 2003). Les mécanismes dans lesquels sont impliquées les protéines cibles sont donc régulés indirectement par les rédoxines, de par l'inhibition ou la stimulation de leur activité. Cette voie de régulation des activités enzymatiques est appelée régulation redox. En cas de stress, des radicaux libres comme les ROS (Espèces réactives de l'oxygène) peuvent être toxiques pour l'embryon à des concentrations élevées. Pour maintenir ces radicaux à des concentrations adéquates, les plantes possèdent, en plus des rédoxines, d'autres éléments antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques.

Des liens étroits ont été établis entre les rédoxines et le potentiel redox. Les connaissances actuelles montrent que le potentiel redox est susceptible de moduler la prolifération, la différentiation, voir la mort cellulaire, en modifiant l'état redox d'un certain nombre de facteurs de transcription lors du stress oxydant. Les rédoxines participent donc à l'adaptation cellulaire par des équilibres dithiols-disulfures. Parmi les rédoxines, les systèmes des thiorédoxines (Trxs), des glutarédoxines (Grxs) et des peroxyrédoxines (Prxs), sont les plus étudiés pour comprendre ces mécanismes.

2.1 *Thiorédoxines*

Les thiorédoxines (Trxs) sont de petites protéines avec une masse moléculaire comprise entre 12 et 14 kDa. Elles possèdent une structure caractéristique avec 4 hélices α entourées par 5 feuillets β (βαβαβαββα) (Jeng et al., 1994; Weichsel et al., 1996; Capitani et al., 2000), et un site actif impliqué principalement dans des régulations redox. Elles sont présentes chez les procaryotes et les eucaryotes. Le nombre des membres de la famille des Trxs a sensiblement augmenté. Suivant la structure en acides aminés, deux familles Trxs peuvent être distinguées. Une première famille de protéines, contenant le domaine spécifique des Trxs, alors que la deuxième famille est composée de la fusion de plusieurs domaines de thiorédoxine. La première famille est très importante pour les plantes. Plus de 47 gènes de Trxs ont été identifiés dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (Meyer et al., 2002; 2005, 2008). Les génomes du riz et de *Chlamydomonas reinhardtii* présentent les mêmes complexités (Meyer et al., 2006; Lemaire et al., 2003).

Les membres de Trxs ont été divisés en six groupes majeurs : les Trxs *f*, *h*, *m*, *o*, *x*, *y et z*. Les Trxs *f*, *m x*, *y et z* sont localisées dans la chloroplaste, les Trxs *o* dans la mitochondrie, et les Trxs *h* sont cytosoliques (Besse et al., 1996; Kobrehel et al., 1992 et Yamazaki et al., 2004). Ces Trxs possèdent un centre actif très conservé de type (WCGPC), grâce auquel, elles peuvent fonctionner comme des agents oxydo-réducteurs dans de multiples réactions chimiques (Arner et al., 2002; Gelhaye et al., 2004). Pour les Trxs chloroplastiques, l'activation des Trxs se fait par réduction catalysée par la ferredoxin-Trx-réductase (FTR). Alors que les Trxs cytosoliques font partie d'un système thiorédoxine NADP-dépendant (NTS), où elles sont associées au NADPH et à une enzyme dénommée NADP-thioredoxin réductase (NTR).

Récemment, un autre type de Trx a été identifié chez *Medicago truncatula*. Il s'agit de Trx *s* présente dans le réticulum endoplasmique, ce type de Trx est impliqué dans la symbiose (Alkhalfioui et al., 2008). Ce nouveau type de Trx semble être spécifique de certaines espèces comme les légumes, ou deux isoformes ont été identifiés chez *Medicago truncatula*. La comparaison des structures protéiques des Trxs *s* et Trx *h* chez *Medicago truncatula* montre que les extrémités N-terminales sont identiques, et peuvent correspondre donc à des peptides signaux. Les deux isoformes isolés de Trxs *s* possèdent des sites actifs de type LCSPC ou WCGQNC différents des sites actifs des autres Trxs. Au contraire du sites WCGQNC, le site LCSPC, semble possèder une activité catalytique (Alkhalfioui et al., 2008).

2.1.1 Le système thiorédoxine *h*

La réduction des Trxs *h* se fait grâce au couple NTR/NADPH (Figure. 3) (Jacquot et al., 1994; Schurmann Jacquot, 2000; Williams et al., 2000).

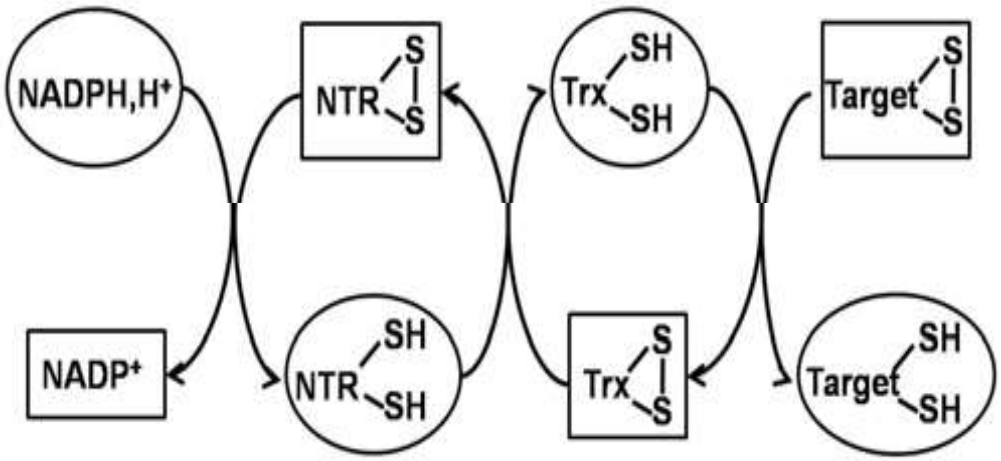


Figure 3 : Schéma du système NADPH-thiorédoxine réductase (NTR). La réduction de Trx *h* des plantes est catalysée par NADPH-thioredoxin reductase utilisant NADPH comme source d'électrons. Une fois réduites, les Trx h sont capables de réduire les liaisons ponts disulfures des protéines cibles. (Zahid et al., 2008).

Le NTR appartient à la famille des flavoprotéines disilfures oxydoréductases. Il catalyse le transfert des électrons à partir du NADPH, au site actif de la Trx *h* oxydée, à travers le système FAD (Mustacich et al., 2000). Le système NTR est un homodimère avec des unités de 35 kDa contenant chacune un groupe FAD et un domaine NADP dépendant. Des études récentes ont porté sur des mutants d'*Arabidopsis thaliana*. L'insertion d'un ADN-T dans le gène codant pour le système NTR a montré que ce dernier est très impliqué dans le développement des plantes, tel que le mouvement du pollen et la maturation de la graine.

Toutefois, une plante portant un gène NTR déficitaire reste vivante mais avec des graines caractérisées par un phénotype ridé, une faible croissance de la plante et un pollen avec un mouvement réduit. Ce résultat montre qu'au contraire des mammifères, les plantes peuvent avoir une autre voie alternative pour la réduction des Trx *h,* du moins chez *A. thaliana* (Reichheld et al., 2007).

De multiples isoformes de Trx *h* et de NTR ont été identifiées dans les plantes, cinq Trxs *h* et un système NTR, ont été décrits chez le blé (*Triticum aesitivum*) (Gautier et al., 1998; Serrato et al., 2001; Cazalis et al., 2006; Serrato et al., 2002). Cependant deux Trxs *h* ont été caractérisés dans la graine de l'orge (*Hordeum vulgare*) (Maeda et al., 2003) ainsi que deux enzymes NTR (Shahpiri et al., 2008). Onze gènes codant pour des Trxs *h* (Meyer et al., 2002, 2005) et trois isoformes NTR (Serrato et al., 2004 ; Reichheld et al., 2005) ont été caractérisés chez *Arabidopsis thaliana.* Dans les travaux de Meyer et al. 2006 et Nuruzmann et al. 2008, au moins neuf systèmes Trxs *h* dans le riz (*Oryza sativa*) ont été identifiés dans la base de données de "The Institute for genomic research" (TIGR). Dans la même étude, deux systèmes NTR ont aussi été identifiés, dont l'un des gènes NTR (Os06g22140) avec deux codons méthionine, codant probablement autant pour des systèmes protéiques cytosoliques que mitochondriales, comme chez *A. thaliana* (Mayer et al., 2005). La comparaison des bases de données montre que le nombre de gènes Trx *h* identifié dans le riz est inférieur par rapport à ceux d'*A. thaliana* (Meyer et al., 2006; Nuruzmann et al., 2008).

Les Trxs *h* des plantes ont été divisées en trois groupes (Figure 4) (Juttner et al., 2000; Gelhaye et al., 2004a).

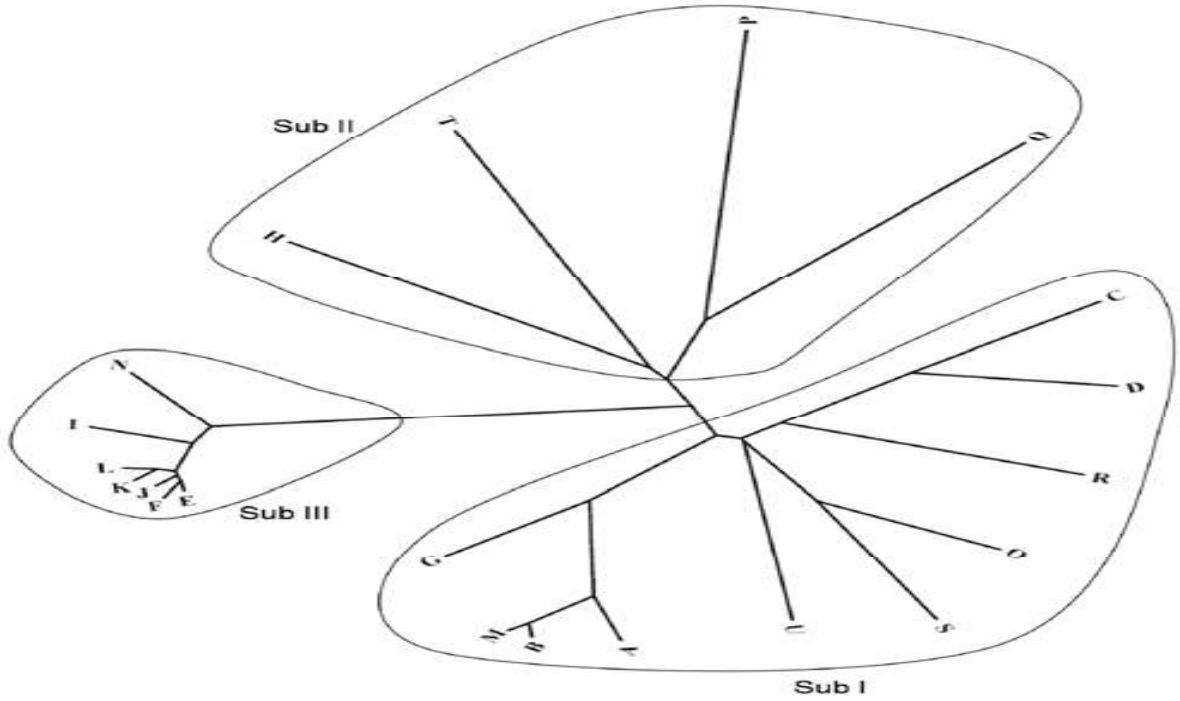


Figure 4 : Arbre phylogénétique des Trx *h,* à partir des céréales *et* d'*Arabidopsis thaliana*. L'arbre phylogénétique des Trx *h* est établi à partir du programme CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/ clustalw) avec des séquences de Trx *h* du centre national pour les informations biotechnologiques et les bases de données SWISSPROT. Les Trx *h* sont divisées en trois groupes: groupe 1, groupe 2 et groupe 3. A-N : céréales; O-U; *Arabidopsis*. Les nombres d'accessions sont respectivement A-C: *Triticum aestivum*, AA88O64.1, AAL24517, et 27461140, D : *Oryza sativa* 42642; E: *Hordeum bulbosum* Q9SWG6; F: *Lolium perenne* Q9SWG4; G-I: *sativa* Q9FRT3, Q851R5, et Q8H6X4 respectivement; J: *Phalaris coerulescens* Q9S753; K: *cecale cereale* Q9SWG5; L: *Triticum aestivum* Q8H6X0, M: *T. durum* O64395; N: *Zea may* Q8H6X5; O-U: *Arabidopsis thaliana,* respectivement Q39241, Q9CAS1, Q9XIF4, Q39239, Q42403, Q38879 et P29448. (Zahid et al., 2008).

Dans la plupart des cas, la différence entre les isoformes *h* des différents groupes réside dans l'extrémité N-terminale et C-terminale. Les isoformes du premier groupe sont des protéines de la sève élaborée et elles sont généralement cytosoliques. Au contraire des Trxs *f* et *m*, les Trxs *h* ne possèdent pas de peptides signal (Ishiwatari et al., 1998). Une fois synthétisées, les Trx *h* sont capables d'induire leur propre transport intracellulaire. Certaines Trx *h* du riz sont caractérisées par la présence des séquences MAAEE et RKDD, respectivement aux extrémités N-terminale et C-terminale. Ces dernières sont très importantes dans leur mouvement cellulaire, car elles sont cytosoliques (Ishiwatari et al., 1998).

Les membres du deuxième groupe exposent un domaine N-terminal hydrophobe prolongé, dont le rôle reste à élucidé. Des études ont montré qu'il s'agit de protéines membranaires (Shi and Bhattachary, 1996). Le troisième groupe est plus complexe, il

contient des Trx *h* classiques, et des formes intermédiaires entre les Trx et les Grx avec un site actif de type CXXS, dont l'activité ressemble à celle des Grxs et des protéines disulfides isomérases (PDI) (Serrato et al., 2008).

2.1.2 Rôles des thiorédoxines *h*

Initialement, deux Trxs *h* ont été extraites et partiellement purifiées à partir du grain de blé (Vogt and Follmann, 1986). Depuis, deux clones d'ADNc codant une thioredoxine *h* de blé tendre (TaTrx*h*1), et une thioredoxine *h* de blé dur (TdTrx*h*1) (Guatier et al., 1998) ont été isolés et caractérisés. Les structures primaires déduites des clones d'ADNc des thiorédoxines *h* TaTrx *h*1 et TdTrx *h*1 sont très conservées (96% d'identité entre elles). Elles possèdent une extension N-terminal très riche en résidus alanine, dont l'analyse révèle un domaine transmembranaire putatif de 20 résidus. Elles présentent de fortes homologies avec la Trx *h* des céréales (70 à 80%) et les Trxs *h* de dicotylédones (60%).

2.1.2.1 Germination et maturation du grain

Les Trxs cytosoliques *h* ont été identifiées comme faisant partie des protéines majeures de la sève élaborée, pouvant ainsi fonctionner comme des agents de transduction d'information et de pouvoir réducteur entre les organes de la plante. Les Trx *h* interviennent au cours de la germination du grain de blé, où elles participent, au niveau de l'albumen, à la mobilisation des réserves nécessaires au développement de nouveaux tissus, et à la croissance de l'embryon (Kobrehel et al., 1992; Lozano et al., 1996). Ceci augmente leur sensibilité à la protéolyse en réduisant des enzymes impliquées dans la mobilisation des protéines de réserve, ou *via* des inhibiteurs des enzymes comme la α-amylase et la pullulanase, et l'activation d'une protéase spécifique : la thiocalsine. (Kobrehel et al., 1992; Besse et al., 1996). L'implication des Trx *h* dans la dégradation de l'endosperme du blé, se fait aussi par la conversion du fructose1-6-bisphosphate et du fructose 6-phosphate, par l'activation de la pyrophosphate fructose -6-phosphate -1-phosphotransferase (PFP) et de multiples enzymes dans le cycle glycolytique (activation de l'aldolase, triose phosphate isomérase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogènase, enolase et pyruvate phosphate dikinase). L'ensemble de ces mécanismes permet de faciliter la mobilisation d'azote et de carbone dans l'endosperme (Marx et al., 2003 ; Montrichard et al., 2003). La réduction des protéines de réserve (gliadines, gluténines, globulines et amidon) par les Trxs *h*, est facilitée par l'activation de

cette dernière par NADPH catalysée par NADP-Trx réductase (NTR) (Jacquot et al., 1994 ; Shurmann and Jacquot 2000; Williams et al., 2000), ce qui forme le système NADP/thioredoxine (NTS) localisé au niveau de la graine, riche en activités physiologiques. Ce rôle des Trxs *h* dans la mobilisation des protéines de réserve a été confirmé par des études montrant la localisation des Trxs *h* dans la couche d'aleurone et le scutellum des graines de blé tendre en stade de germination (Serrato et al., 2001).

La surexpression de la Trx *h* dans l'endosperme de l'orge améliore l'activité des enzymes de débranchement d'amidon et accélère l'apparition de l'α-amylase et la vitesse de germination. Il a été proposé aussi qu'elle est impliquée dans l'acheminement de l'acide gibbérillique, qui est une hormone de croissance (Cho et al., 1999; Wong et al., 2002). Alors une inhibition partielle de l'expression des Trxs *h* par des gènes antisens induit un ralentissement de la vitesse de germination et la formation de polymères gluténiques de haut poids moléculaire (Guo et al., 2007). Les protéines de réserve semblent être les cibles majeures des Trxs *h,* mais fort de ces multiples rôles des Trxs *h* dans les processus métaboliques, d'autres cibles protéiques du NTS ont été mises en évidences dans les graines de céréales. Pour identifier les cibles protéiques des Trxs *h*, différentes stratégies ont été développées pour avoir plus d'informations sur les rôles des Trxs *h* dans la graine et les autres parties de la plante (Holmgren et al., 1979), parmi lesquelles celles basées sur les mécanismes de l'activité réductase des Trxs *h*. Les techniques de mutation de résidus de cystèines au niveau du site actif constituent une alternative pour identifier les cibles des Trxs *h* (Verdoucq et al., 1999).

Actuellement, les listes des cibles des Trx contiennent un grand nombre de protéines thiols (Balmer et al., 2003, 2004; Lemaire et al. 2004; Maeda et al., 2004, 2005; Wong et al. 2004; Yamazaki et al., 2004; Alkhalfioui et al., 2007).

Le meilleur moyen pour étudier les Trxs des plantes reste la validation de ces résultats dans la plante même. Des mutants par l'extinction de gènes de Trx *h* d'*Arabidopsis thaliana* ont été obtenus, mais le succès des résultats est limité, peut être du à la redondance des gènes de Trxs (Meyer et al., 2005). En outre, de récentes données ont montré des interactions réciproques entre les complexes de Trx et de Grx, dues à la ressemblance entre les cibles des Trx et celles de Grx (Rouhier et al., 2005; Michelet et al., 2006). Des travaux plus approfondis, utilisant d'autres techniques comme l'interférence ARN (RNAi), sont

nécessaires pour comprendre les rôles exacts et les mécanismes moléculaires des Trxs des céréales.

2.1.2.2 Stress oxydatif

Après imbibition du grain, la reprise de la respiration et du processus métabolique, provoquent la production des ROS, comme le peroxyde d'hydrogène, les radicaux d'hydroxyles et les superoxydes. Ces éléments peuvent causer des dommages pour les molécules biologiques. La production des ROS peut être accélérée à cause des conditions environnementales. Pour faire face aux éléments toxiques, les plantes ont développé des systèmes de protection parmi lesquels le système des Trxs *h,* impliqué dans ces mécanismes de protection par l'activation d'enzymes à la suite des actions de réductions.

Les tissus de la graine peuvent souffrir d'un stress oxydatif, soit par un manque d'eau lors de la maturation du grain, ou un excès d'eau lors des premières étapes de germination. Pour protéger les tissus vivants, les plantes ont développé des mécanismes de protection, dont la réduction des Trxs *h* qui augmente pendant ces conditions de stress (Lozano et al., 1996; Marx et al., 2003; Serrato and Cejudo, 2003). Les Trxs *h* semblent agir dans le scutellum et la couche d'aleurone, tissus qui restent vivants dans le grain mature, et qui permettent à la plante de développer les mécanismes de tolérance à la dessiccation. L'immunolocalisation nucléaire a permis de confirmer la prédominance de la Trx *h*2 dans la couche d'aleurone et le scutellum, durant les dernières étapes de développement du grain (Serrato and Cejudo, 2001) et pendant la germination (Serrato et al., 2001). Pendant le stress abiotique, l'analyse de l'expression des Trxs *h* dans la graine et la plantule du blé, montre une différence d'expression entre l'aleurone et les autres tissus (Cazalis et al., 2006). La couche d'aleurone est connue pour sa richesse en lipides, ces derniers étant utilisés comme source d'énergie pour l'activation du métabolisme après imbibition grain. Au cours de la germination, le métabolisme des lipides génère des radicaux libres, tels que le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'acides gras, qui peuvent avoir un effet néfaste sur la structure de la membrane cellulaire. Dans ce cas, les Trxs *h*, interviennent dans la protection des tissus cellulaires en servant de donneur d'électrons aux Prxs pour les réactiver afin de réduire le H_2O_2.

Récemment, un système redox doté d'une activité antioxydative et localisé dans le noyau des graines du blé a été identifié (Pulido et al., 2009). Cette découverte montre

l'implication du système NTR/Trx *h* dans la réduction de la 1-Cys Prx, impliquée à son tour dans la protection contre le stress oxydatif, et cela par le contrôle du niveau d'hydrogène de peroxydes nucléaires.

La découverte de la présence de la Trx *h* dans la mitochondrie (Florencio et al., 1988), en plus des autres isoformes de Trx *o*, suggère la présence de Trxs supplémentaires dans cette organelle. Dans la mitochondrie, les Trx *h* semblent donc jouer un rôle déterminant et la détoxification des ROS (Gelhaye et al., 2004b).

L'ensemble de ces données montre que le système des Trxs *h* est impliqué dans la protection contre les éventuels dommages des ROS, dans le grain mature, et dans le jeune embryon en stade de maturation et de germination.

2.1.3 Thiorédoxines chloroplastiques

Les Trxs chloroplastiques sont aussi des protéines de petites tailles (12kDa), localisées généralement dans les organes vivants des plantes. La découverte des Trx chloroplastiques a été liée aux études menées sur la photosynthèse. Deux Trxs chloroplastiques ont été découvertes, il s'agit des Trxs *f* et *m*. Ce sont des Trxs dépendantes de la lumière, et elles interviennent dans la régulation des enzymes de plusieurs métabolismes, et particulièrement les enzymes du cycle de Calvin (Schurmann and Jacquot, 2000). Sous l'effet de la lumière, les électrons de la chaîne photosynthétique, transférés à partir de la membrane des thylakoïdes permettent la réduction des ferrédoxines (Fd), qui par la suite transfèrent ces électrons aux Trxs par l'intermédiaire d'un complexe spécifique contenant une enzyme appelée la ferrédoxine thioredoxine réductase (FTR). Les Trxs réduites sont alors capables de réduire les ponts disulfures des protéines cibles. L'activation des protéines cibles, se fait donc par le système férredoxine thioredoxine (Fd/Trx) (Figure 5).

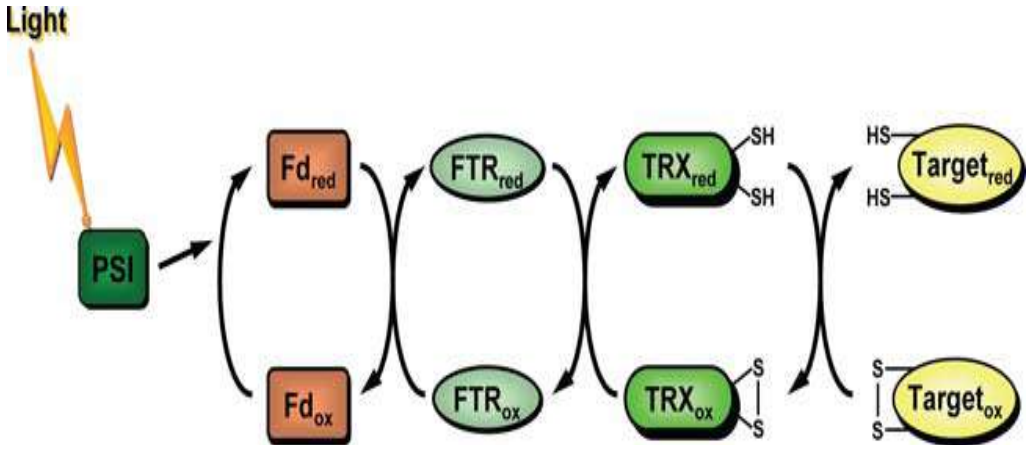


Figure 5 : Schéma représentatif du rôle du système ferrédoxine/thiorédoxine réductase (FTR) dans l'activation des Trx chloroplastiques, qui à leur tour réduisent les protéines cibles. PSI: photosystème I, Fd: ferredoxine, FTR: ferredoxine thiorédoxine réductase, TRX: thiorédoxine, red: réduit, ox: oxydé (Lemaire et al., 2007).

Depuis la découverte des Trx chloroplastiques, plusieurs études ont été menées afin de comprendre les mécanismes moléculaires des enzymes dont l'activation dépend de ce type de Trxs: la NADP Malate Dehydrogénase (NADP-MDH) (Miginiac and Lancelin, 2002) et la Fructose-1,6-biphosphatase (FBPase) (Jacquot et al., 1997). Les structures de plusieurs Trxs des différents organismes photosynthétiques ont été établies (Dai et al., 2004). La disponibilité des séquences du génome des organes photosynthétiques a conduit à une percée importante dans la découverte et la mise en évidence des multiplicités des Trxs dans les plantes, en incluant de nouveaux types de Trx chloroplastiques (Lemaire et al. 2003; Gelhaye et al., 2005; Meyer et al., 2005). Avec le développement des outils de la protéomique, plus de 300 cibles potentielles de Trx chloroplastiques ont été identifiées (Buchannan and Balmer, 2005; Hisabori et al., 2005; Michelet et al., 2006). Ces cibles sont impliquées dans différents processus, principalement le métabolisme du carbone, mais aussi l'assimilation de l'azote, la biosynthèse des acides gras et le métabolisme des protéines. La mise en évidence de ces cibles a permis de comprendre davantage les fonctions des Trxs chloroplastiques. L'utilisation d'une colonne de Fd-sepharose dans la purification de la FTR par Droux et al., 1987, a permis de comprendre l'ordre de réactions impliquées dans la modulation des enzymes chloroplastiques en présence de la lumière (Figure 6).

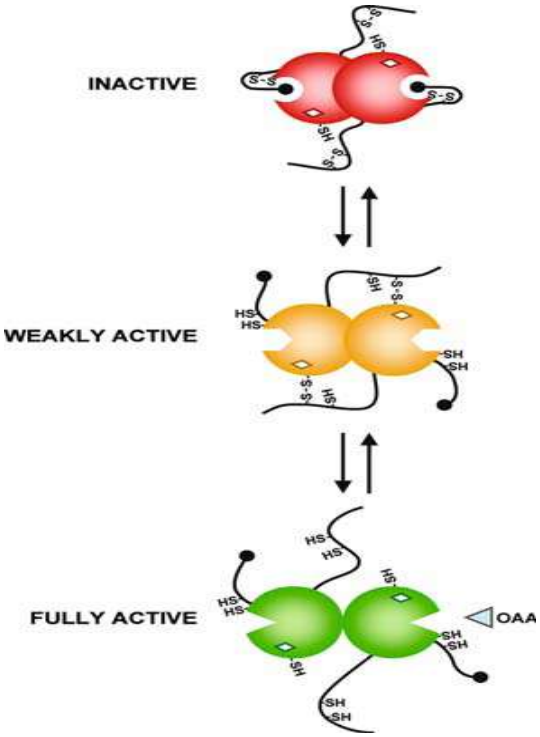


Figure 6 : Représentation schématique du mécanisme d'activation de la NADP-MDH du Sorgho (Lemaire et al., 2007).

Ces découvertes liées aux fonctions des Trxs, ont constitué un atout majeur dans la compréhension des mécanismes d'activation/désactivation des enzymes à travers les échanges thiols/disulfudes. Récemment, des interactions avec d'autres systèmes de régulation redox comme la glutaredoxine (Grx) et le Glutathion (GSH) ont été découvert (Michelet et al. 2006).

2.1.4 Thiorédoxines *f* et *m* dans les tissus non photosynthétiques

Outre leur présence dans les chloroplastes, les Trxs *f* et *m* ont été localisées dans les tissus non photosynthétiques, chez le pois (*Pisum sativum*), dans les racines et les graines (Barajas-Lopez et al., 2007; Pagano et al., 2000). Pour confirmer l'expression des protéines et identifier de possibles fonctions de ces Trxs dans les organes non photosynthétiques, leurs présences ont été analysées par immuno-localisation (Traverso et al., 2008). Utilisant les anticorps anti-PsTrx *m* et anti-Ps Trx *f* , il a été conclu que les Trxs *f* se trouvent localisées dans des cellules spécifiques, proches du xylème et du cambium, alors que les Trxs *m* sont localisées dans les tissus vasculaires des feuilles, des tiges et des racines. La découverte des Trxs *m* et *f* dans les tissus non photosynthétiques suggère que ces dernières possèdent d'autres

fonctions que celles déjà décrites dans les tissus photosynthétiques. Initialement, la présence des Trxs dans les tissus vasculaires a été liée aux processus de différentiation cellulaires pendant les premières étapes de développement (Ishiwatari et al., 2000). Récemment, des isoformes de Trx *m* ont été identifiées dans les amyloplastes, et isolées à partir de l'endosperme du blé (Balmer et al., 2006a). Comme les chloroplastes, l'amyloplaste contient le système ferredoxine/Trx composé de la ferredoxine, la ferredoxine-Trx (FTR), et la Trx *m*. Mais au contraire des chloroplastes, les ferrédoxines sont réduites par les NADP régénérées métaboliquement *via* la ferredoxine-NADP réductase. Dans d'autres travaux, Balmer et al., 2006b ont proposé que la présence des Trxs dans les nervures vasculaires puisse servir comme des signaux thiols entre les différentes parties de la plante.

Pour mettre en évidence les autres fonctions des Trxs *f* et *m* dans les tissus non photosynthétiques, des complémentations hétérologues avec des levures mutantes EMY63 (Muller et al., 1991), utilisées auparavant pour déterminer les fonctions des Trx des plantes (Mouaheb et al., 1998 ; Vignols et al., 2003 ; Traverso et al., 2007), ont été réalisées. Les résultats obtenus montrent que les Trxs *f* et *m* du pois des tissus non photosynthétiques, sont impliquées dans les processus de détoxification des peroxydes. Cependant les Trxs *m* semblent plus impliquées dans la protection contre le stress oxydatif, probablement par la réduction de la 2-Cys Prx (Traverso et al., 2008).

Dans les tissus non photosynthétiques, une question a été soulevée s'agissant de la source de réduction des Trxs *f* et *m*. La possibilité de l'implication de la NADPH catalysée par le système NTR a été identifiée *in vitro* (Traverso et al., 2008). L'implication de la ferredoxine et du système FTR dans la réduction des Trxs est probable dans les amyloplastes, puisque ces derniers, contiennent les enzymes nécessaires à la réduction de la ferredoxine (Balmer et al., 2006). De plus, l'expression d'un gène de FTR a été identifiée dans les racines de pois (Barajas-Lopez et al., 2007).

La découverte des Trxs *f* et *m* dans les tissus non-photosynthétiques constitue une voie intéressante qui peut être approfondie pour déterminer les rôles exacts dans ces tissus, et principalement l'implication dans la protection contre le stress oxydatif. Ainsi, les Trxs *f* et *m* peuvent être utilisées pour améliorer la qualité germinative des céréales et le blé en particulier.

2.2 *Glutarédoxines*

Les glutarédoxines (Grxs) sont des petites protéines qui ressemblent aux Trxs et présentent une structure tridimensionnelle similaire. Elles appartiennent à la superfamille des Trxs mais sont dotées d'un potentiel redox plus positif que les Trxs (- 190 et -230 mV) (Aslund et al., 1997). A l'inverse des Trxs elles peuvent être réduites par le glutathion réduit. La première Grx de plantes identifiée est celle du riz en 1994, et les Grx constituent après les Trxs, les rédoxines les plus étudiées. Le groupe des Grxs est plus hétérogène que celui des Trxs, 27 gènes sont connus à ce jour dans *Oryza sativa*, 31 gènes dans *Arabidopsis thaliana* et 36 gènes dans le peuplier (*Populus trichocarpa*). Des analyses génomiques récentes (Lemaire, 2004; Rouhier et al., 2004) ont identifié trois groupes de Grxs (

Figure 7) selon les caractéristiques de leur site actif. Le premier groupe comporte un site actif dit classique, de type CPYC. Le deuxième groupe, « CC-type » a un site actif de deux cystéines successives CC suivies d'un acide aminé quelconque puis de cystéine ou une sérine (S), (CCXC ou CCXS). Ce groupe semble être spécifique des plantes supérieures. Le troisième groupe « C-type » comporte un site actif d'une seule cystéine : CGFS (Navrot et al. 2006), groupe décrit aussi chez *E. Coli* et chez les levures.

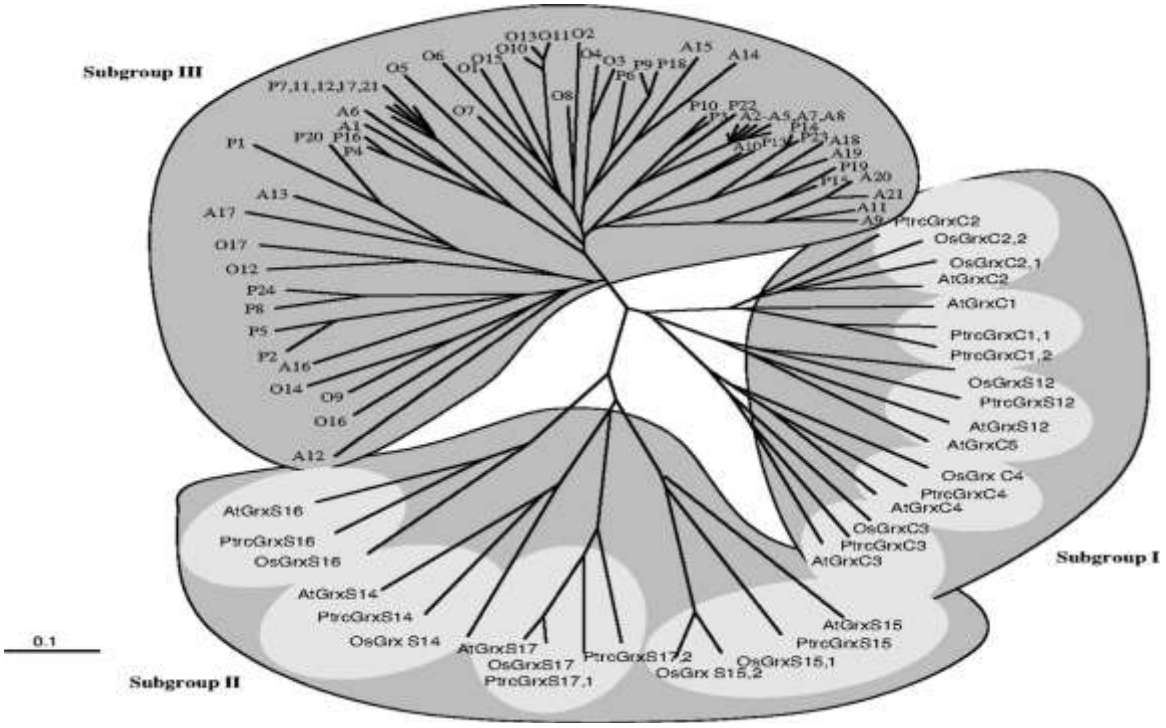


Figure 7 : Arbre phylogénétique des Grxs, établi à partir des séquences d' *A. thaliana, P. trichocarpa*, et *O. sativa*. L'arbre phylogénétique est construit grâce au programme Clustaw. Les nombres d'accessions de *P. trichocarpa* appartiennent aux groupes I et II. Pour le groupe III, les séquences sont identifiées par les lettres A, P et O pour les espèces (*A. thaliana, P. trichocarpa* et *O. sativa*) (Rouhier et al., 2006)

2.2.1 Glutarédoxines : fonctions et cibles

Les Grxs sont moins bien connues que les Trxs, car les recherches de protéines cibles ont débuté après celles des Trxs. Cependant, le nombre de gènes et de cibles identifiés suggère que les Grxs sont impliquées dans beaucoup de fonctions biologiques. On leur attribue un rôle majeur dans la réponse directe ou indirecte au stress oxydatif. Il a été rapporté que les Grxs exhibent différentes activités comme la déhydroascorbate réductase (Park and Levine, 1996; Washhburn and Wells, 1999), la glutathione peroxydase (Collinson et al., 2002), et la glutathione-S-transférase (Collinson and Grant, 2003). Selon les travaux de Sha et al., 1997 et Rouhier et al., 2003, la Grx réduit la déhydrogénase ascorbate (DHA). Cette voie constitue une alternative à la réduction de la DHA par la déhydrogénase ascorbate réductase (DHAR), et permet la libération de l'ascorbate, lui-même considéré comme molécule antioxydante. Un autre rôle des Grx contre le stress oxydatif réside dans la réduction de la peroxyrédoxine (Prx). Chez les plantes, les Prxs sont classées en cinq groupes, et les Grxs sont capables de réduire les Prxs du deuxième groupe (II-Prx), à l'exemple de celles du peuplier (Rouhier al., 2002, N Rouhier, résultat non publié). Tandis que les Prxs des autres groupes sont réduites par les Trxs (Rouhier et al., 2003; Bréhelin et al., 2003; Finkemeir et al., 2005).

Parmi les autres fonctions des Grxs des plantes, on trouve la réduction des isoformes des Trxs *h* du peuplier, nommées Ptrc Trx*h*4 (Gelhaye et al., 2003). Des Trxs chloroplastiques *f* sont aussi des cibles des Grxs, puisqu'elles sont régulées par glutathionylation (Michelet et al., 2005). Ainsi les Grxs sont capables de catalyser des réactions de glutathionylation et de déglutathionylation. Le mécanisme constitue un lien de fonctionnement entre des Grxs et des Trxs. Grâce aux outils de la protéomique, 94 autres cibles protéiques ont été identifiées (Rouhier et al., 2005), mais certaines de ces protéines peuvent aussi être la cible des Trxs. D'autres études sont donc nécessaires pour valider une action réductrice de la glutaredoxine sur les protéines cibles identifiées, et pour identifier de nouvelles cibles (Rouhier et al., 2006).

La Figure 8 regroupe les différentes fonctions catalysées ou supposées être catalysées par les Grxs des plantes.

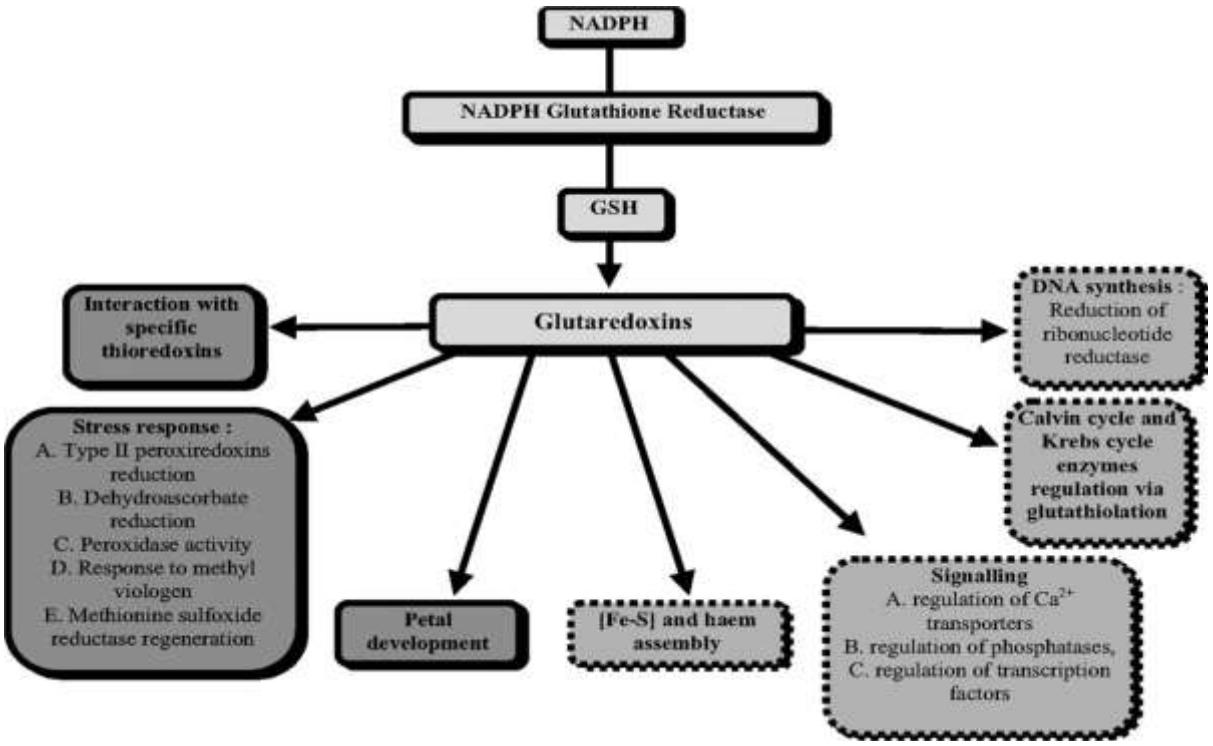


Figure 8 : Les rôles confirmés ou supposés des Grxs chez les plantes, les Grxs sont dans la plupart des cas réduites par le Glutathion. Les fonctions confirmées sont situées à droite et indiquées par des traits pleins. Les fonctions supposées sont situées à gauche et soulignées par des traits pointillés, ces fonctions sont déduites en fonctions de la Grx chez d'autres organismes (Rouhier et al., 2006).

Des études approfondies sont nécessaires pour exploiter la fonction de la réduction des Trxs *h* par les Grxs. Chez les céréales et le blé en particulier, les Trxs *h* sont présentes dans le grain, il serait intéressant de voir si la modulation de la Grx peut contribuer à l'amélioration de la qualité germinative, sachant que les fonctions des Trxs *h* dans la protection contre le stress chez le blé sont largement établies.

2.2.2 Les GRL (Glutaredoxine Like Protéine)

Une nouvelle famille de protéines a été récemment découverte dans *Populus trichocarpa*, le peuplier (grâce à l'étude de son génome récemment constitué). Il s'agit de petites protéines similaires aux Grxs et Trxs qui présentent quatre sites composés de motifs CxxC. Le motif permettant la classification des protéines comme des GRL concerne essentiellement quelques acides aminés au niveau de l'extrémité C-terminale. Des familles de GRL protéines ont été identifiées, en se basant sur huit résidus de cystéines ordonnés sous

forme $CxxCx_7CxxC$. Ainsi 19 membres de cette nouvelle famille de gènes on été trouvés dans *populus trichocarpa*. L'étude du génome de *populus trichocarpa*, montre que la famille des GRL est assez large. On dénombre trois sous groupes avec au moins 12 isoformes dans le peuplier, dont 8 possèdent une extrémité N-terminale comme peptide signal. Des analyses bioinformatiques ont permis de prédire que 6 isoformes de ces GRL sont chloroplastiques, 2 mitochondriales, les autres isoformes dépourvues de peptide signal sont supposées être cytosoliques.

Les génomes *d'Arabidopsis thaliana* et du riz (*Oryza sativa*) sont disponibles. Grâce aux bases de données TIGR et MIPS (http://www.tigr.org) (Arabidopsis Genome Initiative 2000; International Rice Genome Sequencing Project 2005), 15 et 17 isoformes de GRL ont été identifiés respectivement chez *Arabidopsis thaliana* et le Riz. Cependant aucune séquence homologue aux GRL n'a été trouvée dans *Chlamydomonas reinhardtii*, et seulement deux isoformes de GRL sont isolées chez les mammifères (*Homo sapiens et Mus musculus*) et la drosophile (*Drosophila melanogaster*).

Le rôle des GRL est encore inconnu et leur caractérisation en est à ses débuts. Il semblerait que certaines GRL pourraient êtres impliquées dans la réponse aux infections pathogènes ou aux changements de conditions lumineuses. La succession de motifs CxxC dans la même chaîne polypeptidique pourrait conférer à ces protéines des rôles particuliers, ainsi elles peuvent être impliquées dans des processus redox (Navrot et al., 2006).

2.3 *Peroxyrédoxines*

2.3.1 Classification

Les peroxyrédoxines (Prxs) sont des peroxydases récemment étudiées, elles contiennent des résidus de cystéines très conservés au niveau du site actif (Chae et al., 1994). Elles sont présentes dans tous les organismes, sous de multiples isoformes (Rouhier and Jacquot, 2002; Dietz et al., 2003). On en dénombre 6 isoformes chez les mammifères, 5 dans *Saccharomtces cerevisiae* et *Drosophila melanogaster* et plus d'une dizaine ont été identifiées dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (Rouhier et al., 2004). Comme les Trxs, les Prxs sont des protéines de petites tailles (17-22 kDa). En se basant sur les mécanismes catalytiques et les similitudes entre les séquences, les Prx peuvent être divisées en 4 groupes (Rouhier and Jacquot, 2002; Dietz et al., 2003) : la 1-Cys-Prx possède un seul résidu de cystéine et les 2-

Cys Prx, Prx Q et II-Prx possèdent deux cystéines localisées à différentes positions de la séquence protéique.

L'alignement des séquences en acides aminés fournit plus d'informations sur chaque groupe de Prx; les structures des différentes Prx au sein du même groupe présentent 70 à 90 % de similitude, alors qu'elle n'est que de 10 à 30 % entre les séquences protéiques des différents groupes.

Le groupe 2-Cys Prx constitue la principale classe des Prxs. Elles sont caractérisées par la présence d'une extrémité N-terminale nécessaire pour le transit de ces Prxs dans le chloroplaste (Baier and Dietz, 1997). Les séquences protéiques contiennent entre 260 et 274 acides aminés, dont les cystéines du site actif sont séparées par 120 acides aminés. Dans ce même groupe, les séquences de Prxs de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été caractérisées dans le noyau (Klughammer et al. 1998). Il s'agit de séquences protéiques dépourvues d'extrémité N-terminale, correspondant au peptide de transit de l'ordre de 60 à 70 acides aminés. Les fonctions des protéines de ce groupe semblent dépendre des Trxs (Cheong et al., 1999; Goyer et al., 2002; Konig et al., 2002).

Récemment, un autre groupe de Prxs chloroplastiques appelé Prx Q a été identifié. Il s'agit de Prx avec des séquences protéiques de 215 acides aminés, y compris le peptide signal (150 AA). Les résidus de cystéines du site actif sont réduits par les Trxs (Lamkemyer et al., 2006), à l'image des Prxs d'*Arabidopsis thaliana* utilisant les Trxs *m* comme donneurs d'électrons (Motohashi et al., 2001).

Les membres de la II-Prx sont présents dans le cytosol, le chloroplaste et la mitochondrie. Les isoformes chloroplastiques sont réduits par les Trxs, alors que les membres cytosoliques d'*A. thaliana* sont exclusivement réduits par les Grx (Bréhélin et al., 2003). Ces données sont contradictoires avec les II-Prx du peuplier, puisque ces dernières sont réduites par les Grxs ou les Prxs (Rouhier et al., 2001).

Finalement, le dernier groupe des Prxs de plantes, appellé la 1-Cys-Prx, dépourvue cette fois-ci d'extrémité N-terminale mais possédant une extrémité C-terminale (NLS), a été identifié dans le noyau de l'orge (Stacy et al., 1999). Ce groupe de peroxyrédoxines semble être spécifique du grain, et son activation dépend des Trxs.

Les Prxs d'*Arabidopsis thaliana* ont été caractérisées (Dietz et al., 2003 ; Navrot et al., 2006b), en plus des quatre groupes de Prx, un cinquième groupe a été identifié, il s'agit de la glutathion peroxydase (Gpx), avec un site actif très conservé et activé exclusivement par les

Trxs. Elles étaient aussi caractérisées grâce à leurs homologies avec des protéines de mammifères.

2.3.2 Fonctions des peroxyrédoxines dans les plantes

Après imbibition du grain, la reprise de la germination et de la respiration entraîne la génération des ROS dans les organismes photosynthétiques. La concentration des espèces oxygénées augmente lorsque la plante est soumise à des conditions défavorables, liées à un stress oxydatif. Les plantes ont développé tout un système antioxydant formé d'éléments enzymatiques ou non enzymatiques de faibles poids moléculaires, pour protéger les acides nucléiques, les lipides et les protéines, des éventuels dommages liées aux ROS (Halliwell and Gutteridge, 1990). Récemment les Prxs ont été montrées comme étant capables de participer à la détoxification des alkyles d'hydroperoxydes et de la transformation du H_2O_2 en H_2O.

Satcy et al., 1996 décrit l'expression du gène de 1-Cys-Prx dans la couche d'aleurone et dans l'embryon, codant pour la 1-Cys Peroxyredoxine dotée d'une activité antioxydante. Les 1-Cys Prxs sont les dernières identifiées, et elles sont caractérisées par un seul résidu de Cys au niveau du site catalytique. Grâce à son activité antioxydante, la 1-Cys Prx contribue à la protection contre le stress oxydatif (Haslekas et al., 2003).

De plus, les gènes de Per 1 s'expriment généralement dans les graines, et la protéine correspondante s'accumule dans le noyau des cellules de la couche d'aleurone et de l'embryon (Stacy et al., 1999). La localisation nucléaire et l'activité de protection de l'ADN de cette enzyme, suggèrent que la fonction antioxydante de la 1-Cys Prx, contribue à la protection de l'ADN nucléaire dans les cellules de graines en conditions de stress. Dans les graines des plantes, la fonction antioxydante de la 1-Cys Prx dans le noyau est accomplie par son activation par le système NTR/NADPH comme décrit chez le blé (Pulido et al., 2009). L'implication dans le contrôle de la concentration d'hydrogène de peroxyde nucléaire, suggère que le système NTR-NADPH/1-Cys Prx contrôle aussi l'état redox des protéines nucléaires, importantes dans l'expression des gènes, telles que les facteurs de transcriptions.

Afin de mettre évidence le rôle de la 1-Cys Prx, des plantes transgéniques de tabac ont été obtenues par la surexpression de ce gène (Lee et al., 2000). Les résultats montrent que la fréquence de germination des plantes transgéniques reste identique aux témoins. Cependant, en conditions de stress oxydatif, les plantes transformées résistent mieux que les

plantes témoins, cela confirme le rôle des 1-Cys Prx dans la protection contre le stress oxydatif.

Du fait de sa spécificité d'être exprimée dans le grain par rapport autres Prxs, la 1-Cys-Prx, est la meilleure peroxyredoxine pour protéger le grain des céréales pendant la germination contre le stress oxydatif. Une éventuelle modulation de l'expression de cette dernière pourrait améliorer la qualité germinative des grains de blé.

2.4 *Les éléments du système antioxydant*

Les plantes sont constamment soumises à des variations environnementales ou stress abiotique, tels que la sécheresse, le froid, des températures élevées, mais aussi des stress de type biotique. L'ensemble de ces facteurs peut provoquer une forte production des ROS (Price et al., 1995, Noctor and Foyer, 1998, Schutzendubel and Polle, 2002), parmi lesquelles des radicaux libres comme les radicaux superxoydes ($O_2^{\cdot -}$), les radicaux hydroxyles ($OH^{\cdot}$), et les radicaux peroxydes ($RO^{\cdot}$), ainsi que des formes non radicales comme hydrogènes de peroxydes (H_2O_2). Ces éléments sont produits pendant la réduction de l'oxygène par les cytochromes de la chaîne respiratoire. Le chloroplaste constitue le compartiment de la photosynthèse associé à une forte énergie de transport d'électrons, et donc une réserve d'oxygène, qui peut être à l'origine de la formation des ROS (Asada, 1999). En cas d'excès, l'augmentation de radicaux libres de l'oxygène dans les cellules provoque des dommages cellulaires irréversibles, tels que la peroxydation des lipides ainsi que la dénaturation oxydative des acides aminés et des bases azotées.

La peroxydation des lipides constitués d'acides gras poly-insaturés résulte en une désorganisation des structures membranaires entraînant le dysfonctionnement des protéines qui y sont mêlées ainsi que la libération de pentane et d'aldéhydes qui, à fortes concentrations, s'avèrent toxiques pour la cellule. La dénaturation oxydante des acides aminés conduit à une déstabilisation des structures secondaires et tertiaires des protéines, ainsi qu'à l'inactivation des enzymes. La modification des bases azotées par les radicaux libres de l'oxygène provoque, quant à elle, un arrêt ou une aberration de l'expression du message génétique dans la cellule.

Ces ROS à de fortes concentrations peuvent donc être fatals pour les cellules, par l'altération des fonctions et des structures cellulaires. Cependant les plantes ont développé tout un système de défense pour se protéger contre le stress oxydatif. Ainsi, les cellules

possèdent des antioxydants et des enzymes antioxydatives pour faire face aux cascades de réactions déclenchées par le stress oxydatif dans les organes cellulaires. Parmi ces enzymes antioxydatives, les plus importantes et les plus étudiées sont la Superoxyde dismutase (SOD), l'Ascorbate peroxydase (APX), la Catalase (CAT), et la Glutathion peroxydase. Il existe aussi un ensemble de molécules antioxydantes, de faibles masses moléculaires telles que l'ascorbate, le glutathion, les composés phénoliques et les tocophérols.

2.4.1 Superoxyde dismutase (SOD)

Les isoformes des superoxydes dismutases sont présentes dans tous les organismes aérobiques et dans les compartiments cellulaires pouvant être touchés par le stress oxydatif (Bowler et al., 1992) tels que le cytosol, le chloroplaste et la mitochondrie des plantes. Ces isoformes catalysent la dismutation des anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il existe 3 types de SOD classées en fonction du métal cofacteur associé. Ces trois enzymes sont sensibles aux stress environnementaux, dus à l'accumulation des ROS, comme il a été montré avec le maïs (*Zea mays*). Après traitement hydrique, il a été montré une augmentation des teneurs de TABARs, et la production de superoxydes et d'hydrogène de peroxydes dans les feuilles (Yan et al., 1996). En présence de conditions de stress abiotique, la teneur en TABARs diminue dans les plantes transgéniques surexprimants la CuZnSOD dans le chloroplaste, alors qu'elle reste élevée dans les plantes témoins (Lee et al., 2007).

Les résultats de l'activité de la SOD, obtenus avec différents types de plantes, et dans plusieurs conditions de stress (sécheresse, salinité et variations des températures), suggèrent que différents mécanismes sont impliqués dans la détoxification des ROS. Par exemple en cas de stress salin, l'activité de la SOD augmente dans les racines dès les premières étapes de développement, mais elle reste inférieure à celle de la CAT (Khosravinejad et al., 2008 ; Kim et al., 2005). De même, toujours dans les travaux de Lee et al., 2007, la diminution des teneurs en TABARS est liée aussi la surexpression simultanée de de la CuZnSOD et de l'ascorbate peroxydase (APX).

2.4.2 Ascorbate peroxydase (APX)

L'ascorbate peroxydase (APX) est l'une des enzymes impliquées dans la destruction des H_2O_2 dans le cytosol et le chloroplaste des plantes. Pour cette propriété, elle utilise l'ascorbate comme réducteur. Elle permet aussi d'augmenter le pouvoir de la catalase dans

l'élimination de H_2O_2 dans les compartiments cellulaires. Le développement de plantes transgéniques du tabac par la surexpression d'une ascorbate peroxydase cytosolique du pois, a été effectué par Allen et al., 1997. Les résultats obtenus montraient dans un premier temps, que l'activité de l'APX cytosolique est trois fois supérieure à celle des plantes non transformées, et dont l'effet démontrait une augmentation de la protection des membranes des feuilles du tabac contre les dommages provoqués par l'exposition au méthyl viologen (MV). Reste l'expression simultanée de l'APX avec d'autres enzymes antioxydantes, le meilleur moyen pour améliorer les activités de ces enzymes et conférer une forte tolérance au stress oxydatif (Lee et al., 2007). D'autres travaux ont permis de montrer que, l'activité de l'APX augmentait en cas de stress salin principalement dans les racines de l'orge, mais cette activité reste moindre que celle de la CAT ou de la SOD (Kim et al., 2005; Khosravinejad et al.,2008). Cinq isoformes d'APX ont été identifiées dans le génome entier d'*A. thaliana*. Yamazaki et al., 2004 montraient que l'isoforme APX1 est une protéine cible des Trxs, pouvant être réduites par le système NADPH-Trx dans le cytosol.

2.4.3 Catalase (CAT)

Le niveau intracellulaire en H_2O_2 est régulé par un ensemble d'enzymes antioxydantes, dont la catalase (Willekens et al., 1995), par la décomposition du H_2O_2 en eau et oxygène. Plusieurs travaux postérieurs ont démontré les fonctions, les localisations cellulaires et les profils d'expression de la catalase de certaines plantes (Guan and Scandalios ; 2000a, 2000b ; 2002). Beaucoup d'études ont suggéré que l'expression et l'activité de la catalase sont stimulées pendant le développement d'*Arabidospis thaliana* dans des conditions de stress (Williamson et Scandalios, 1992 ; Guan and Scandalios, 2000b). Récemment, Du et al., 2008 ont étudié les profils d'expressions des trois gènes d'*Arabidopsis thaliana* dans différentes conditions de stress abiotique et en présence d'hormones. Les résultats de cette étude révèlent que la CAT1 joue un rôle important dans l'élimination du H_2O_2 dans les différents stress environnementaux, tandis que la CAT2 et la CAT3 contribuent respectivement à l'équilibre homéostasique des ROS dans la lumière et l'obscurité.

Chez les céréales, le comportement de la catalase a été étudié en présence de conditions de stress. Ainsi Kim et al., 2005 et Khosravinejad et al., 2008, ont montré que l'activité de la catalase augmentait dans les racines de l'orge pendant un stress salin, et cela par rapport aux autres enzymes antioxydantes étudiées en même temps (APX et SOD, POX).

Ce résultat indique que la catalase est une enzyme majeure dans la détoxification des hydrogènes de peroxydes. Des plantes d'orge, déficitaires du gène de la catalase, développaient des lésions nécrotiques (Acevedo et al., 2001). L'augmentation de l'activité de la catalase, particulièrement dans les racines, est expliquée par le fait que ces dernières sont les premiers sites sensibles au stress salin, afin de maintenir un équilibre homéostasique pour le bon développement de la plante. Cependant, l'activité de la catalase en présence de stress salin varie en fonction des variétés du blé comme décrit dans l'étude réalisée par Heidari et al., 2008. La catalase peut donc être considérée comme une enzyme majeure pour améliorer la qualité germinative des céréales.

La catalase a été identifiée comme une cible des Trxs chez *Chlamydomonas* (Lemaire et al., 2004) et *Arabidopsis thaliana* (Balmer et al., 2004). Les études montraient qu'un agent réducteur comme le dithiotriol (DTT), en présence ou en absence de la Trx, l'activité de la catalase de *Chlamydomonas* diminue, alors que celle d'*A. thaliana* reste stable en présence des Trxs. Dans les plantes supérieures, les régulations de la catalase par les Trxs sont discutables à cause de la localisation subcellulaire des deux enzymes, puisque la catalase est localisée dans le peroxyzome, alors qu'aucune Trx n'a été détectée dans ce compartiment jusqu'à présent.

2.4.4 Glutathion (GSH)

Le glutathion (γ-glutamyl-cysteinyl-glycine) (GSH) est un composé très abondant dans les plantes. Il s'agit d'un tripeptide de 307 Da, contenant une liaison inhabituelle entre le groupe amine de la cystéine et le groupe carboxyle du glutamate. Le glutathion est presque présent dans tous les compartiments cellulaires, principalement le cytosol et le chloroplaste. Cependant, le compartiment de biosynthèse est mal défini. Pour *A. thaliana*, ce débat a été tranché, puisque la biosynthèse de la GSH 1 se fait dans les plastides, et la GSH2 dans les plastides et le cytosol (Wachter et al., 2005). A ce jour, le GSH a été isolé dans le chloroplaste pour le blé (Noctor et al., 2002). Alors que la localisation de la biosynthèse des protéines de la GSH chez *A. thaliana* a été résolue, la situation pour les autres espèces est inconnue. Le glutathion possède plusieurs fonctions fondées sur ces propriétés redox. Avec sa forme oxydée (GSSG), le glutathion maintient un équilibre redox dans les compartiments cellulaires. Il est caractérisé par une grande importance biologique, puisqu'il permet un parfait équilibre redox entre les compartiments cellulaires en conditions normales, ou dès le début

d'un stress. Le glutathion intervient dans différents processus: la différenciation cellulaire (Henmi et al., 2001, 2005), la floraison (Ogawa et al., 2001, 2004), la résistance aux pathogènes (Mou et al., 2003; Deprés et al., 2003; Foyer et Noctor, 2005). De récentes études, suggèrent que le glutathion peut jouer un rôle majeur dans les phénomènes « redox signaling » à travers la modification des résidus de cystéines (Meyer et al., 2007). De plus, il peut réguler l'état oxydatif des cystéines directement par la glutathionylation des protéines, par l'intermédiaire de la Grx. Chez les mammifères, la glutathionylation peut moduler l'activité, la localisation et la stabilité d'un certain nombre de protéines. Il a été montré que le GSH est capable de réduire les Grxs (Reichhled et al., 2007), et le système GSH/Grx est consistute une voie alternative dans la réduction des Trxs ou cas ou le NTR est déficitaire (Bashandy et al., 2010).

La fonction du glutathion comme antioxydant durant le stress oxydatif a été abordée durant les quinze dernières années. Le fort potentiel réducteur du glutathion est dû à la présence d'une cystéine nucléophile, et grâce à cette propriété, le glutathion détruit les radicaux cytotoxiques. Le rôle central du glutathion dans la défense contre le stress oxydatif, réside dans la régénération de l'acide ascorbique, caractérisé par son pouvoir antioxydant fort, *via* le cycle ascorbate-glutathion, conduisant à un changement dans le degré d'oxydation du glutathion cellulaire, et ainsi le changement du potentiel redox du glutathion.

Il a été montré également que le glutathion peut se trouver dans la farine du blé sous formes de glutathion réduit (GSH), glutathion oxydé (GSSG), mais aussi sous forme de composés de type glutathion-proteine associés par des liaisons mixtes (Chen and Schofield, 1995; Sarwin et al., 1992). Rhazi et al., 2003 ont montré que le glutathion joue un rôle important dans le contrôle de la polymérisation des protéines. Dans les mêmes travaux, le rapport GSSG/GSH augmente pendant la phase de dessiccation du grain (33 JAA), au même moment que l'accumulation des polymères de protéines. Cependant, il reste à voir si la glutathionylation des polymères peut avoir un effet sur la qualité germinative du blé et le rôle du GSH pendant les premières étapes de germination.

2.4.5 Glutathion réductase (GR) et peroxydase non-spécifique (POX)

La glutathion réductase (GR) est responsable de la réduction du glutathion oxydé, au cours des réactions d'élimination de H_20_2 catalysées par les enzymes antioxydantes APX et GPX (Mittler et al., 2002; Apel and Hirt, 2004). La peroxydase (POX) participe, comme la

catalase, à la décomposition des hydrogènes de peroxydes. Des tests d'activité de la GR et la POX de l'orge, dans des conditions de stress salin, montraient une augmentation de l'activité de ces enzymes dans les pousses (shoots), et plus particulièrement dans les racines (Kim et al., 2005). Ces différences d'expressions entre les racines et les pousses sont liées à l'expression des différentes isoformes des deux enzymes. L'utilisation des techniques de transformation des plantes pour surexprimer la GR a pu montrer que l'activité de cette dernière augmente, ce qui confère à la plante une meilleure tolérance aux stress.

2.5 *L'allergénicité des protéines de réserve*

Le gluten constitue une protéine déterminante dans les propriétés de la farine du blé. Il est également décrit comme responsable du déclenchement de réactions allergènes de type urticaire généralisée, de chocs anaphylactiques, de maladies coeliaques ou d'intolérances alimentaires (qui touchent entre 0,5 et 1% de la population en Europe ou aux USA) chez les patients sensibles. L'exposition de personnes allergiques peut induire des symptômes nasals ou bronchiques voir gastriques. La consommation quotidienne de gluten induit par exemple de manière indirecte des diarrhées chroniques, des anémies (déficit de globules rouges), mais elle peut aussi augmenter le risque de lymphome de hodgkin. Les albumines/globulines et les gliadines du blé, constituent les plus importants éléments allergènes des produits alimentaires à base de blé (Sandiford et al., 1997; McMowat et al., 2003).

Les travaux de Palosuo et al., 2001 et Morita et al., 2003 ont montré que les ω-gliadines du blé sont responsables des allergies liées aux chocs anaphylactiques (WDEIA), de même que les γ-gliadines, qui sont en plus impliquées dans d'autres réactions allergiques comme les allergies urticaires (Vainio et al. 1983; Pblo et al. 1999), alors que les α-gliadines sont considérées comme le facteur principal de toxicité dans les maladies coeliaques (de Ritis et al. 1988; McMowat, 2003). L'implication des gliadines dans des réactions allergiques déclenche plusieurs types de réponses immunitaires comme par exemple dans le cas des maladies coeliaques, où les gliadines sont reconnues par des anticoprs IgA, alors que dans le cas d'un choc anaphylactique ou d'autres allergies, ce sont les IgE qui sont libérés (Varjonen et al., 1997).

Des tests de réactions immunologiques ont été réalisés sur des chiens allergiques aux protéines de réserve du blé, et cela pour établir le degré de responsabilité de chaque type de protéines dans les processus allergéniques. Les travaux de Buchanan et al., 1997, ont permis

de classer les protéines de réserve du blé selon leurs importances dans l'ordre décroissant suivant: gliadines > gluténines > albumines > globulines. Reste à savoir si les allergénicités provoquées par les gluténines et les albumines/globulines ne sont pas liées à des éventuelles contaminations par les gliadines. Dans les mêmes travaux, des études concernant la sensibilité aux différents types de protéines de la fraction gliadique ont été réalisées. Les chiens allergiques sont plus sensibles aux α et β-gliadines, viennent ensuite les ω-gliadines et enfin les γ-gliadines. Il faut signaler que les α et les β-gliadines, sont les plus répondues dans la farine du blé, puisqu'elles constituent environ 60%. Des LMW et HMW gluténines ont été aussi mises en cause dans l'induction du choc anaphylactique (WDEIA). Ces sous unités gluténiques contiennent des épitopes qui leur permettent de réagir avec les IgE chez les personnes sensibles (Battais et al., 2003).

Les protéines de réserve, et principalement les gliadines et les gluténines, sont connues pour leur richesse en liaisons de ponts disulfures (S-S), qui donnent de la stabilité à la protéine. Au niveau de ces ponts disulfures, des interactions sont possibles avec d'autres protéines, ce qui conduit au clivage et à la libération de protéines solubles de petites tailles, et au développement de leurs propriétés fonctionnelles. Les protéines de réserve natives sont les plus responsables des allergies décrites auparavant chez les personnes sensibles. L'hydrolyse des gliadines et des gluténines au niveau des ponts S-S, constitue un moyen de rendre ces protéines non-allergisantes, puisque l'hydrolyse change la conformation de la protéine, ce qui la rend non reconnaissable par les anticorps chez les sujets sensibles. Il existe des protéines capables d'interagir avec les ponts disulfures des protéines de réserve. Ces protéines sont appelées Trxs. Par des réactions d'oxydo-réductions, elles libèrent des protéines de petites tailles, mais qui peuvent à leur tour interagir entre elles pour former des polymères de grandes tailles. La spécificité des Trxs dans la réduction des protéines de réserve soulève la question de la possibilité que cette réduction soit accompagnée par une diminution de l'allergénicité des aliments à base de blé. Dans les travaux de Buchanan et al. 1997, des tests sur la peau de chiens allergiques ont été réalisés par l'injection de solutions de protéines de blé. La mesure de la réponse allergique, après traitement des préparations par la Trx, montre une diminution systématique des zones d'inflammations de la peau des chiens. Cette diminution de l'allergie se confirme surtout à la suite de différents traitements du même chien.

L'action des Trxs dépend de la présence de ponts disulfures au niveau des protéines cibles. Buchanan et al., 1997 ont montré que l'allergénicité diminue principalement après la

réduction des gliadines par la Trx, et surtout les α et β gliadines majoritaires dans la farine de blé et contenant trois ponts disulfures.

La réduction des ponts disulfures par les Trxs rend la protéine plus accessible à l'action protéolytique d'autres enzymes, ce qui diminue les reconnaissances entre les épitopes des gliadines et les anticorps des patients allergiques aux protéines du blé. Waga et al., 2008, ont étudié l'effet de la Trx sur l'immunoréactivité des gliadines, et sur les propriétés rhéologiques de la pâte. La technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) a été utilisée pour estimer l'immunodétection des gliadines provenant de farines de qualités différentes, et traitées par des Trxs en présence des anticorps IgE chez des sujets sensibles. Les résultats obtenus montrent que l'affinité des gliadines traitées par les Trxs, pour les anticorps IgE, diminue sévèrement par rapport aux gliadines natives. Les travaux de Waga et al 2008, ont confirmé des résultats déjà obtenus par Matsumato et al., 2007, qui ont montré que la réduction des protéines solubles du blé par les Trxs diminue fortement l'allergénicité des albumines/globulines chez les personnes sensibles. L'ensemble de ces résultats montre l'importance des Trxs dans l'amélioration des propriétés des produits alimentaires à base de blé. Cependant le prix élevé des composés tels que les Trxs et le NTR, rend l'opération très difficile surtout à l'échelle industrielle. Ainsi le développement de plantes transgéniques, avec une surexpression des thiorédoxines, semble le seul moyen pour résoudre le problème pour les personnes allergiques aux protéines de réserve.

Partie III

Objectif

Notre étude s'inscrit dans l'optique d'une compréhension de la qualité germinative du blé tendre en particulier et des céréales en générale, par le biais de marqueurs et principalement les rédoxines. Par leurs multiples fonctions dans les processus de germination comme la mobilisation des protéines de réserve, et la protection contre le stress oxydatif, les protéines des rédoxines semblent être les biens placés pour aborder la qualité germinative. Il existe de nombreuses rédoxines chez le blé, mais notre approche opte pour la qualité de l'information plutôt que la quantité de données. Nous disposons déjà d'un système modèle de rédoxine chez le blé Soissons formé de trois thiorédoxines *h* (Trx *h*1, *h*2 et *h*3) (Cazalis et al., 2006), d'une glutarédoxine et d'une peroxyrédoxine.

Les thiorédoxines *h* semblent être les mieux placées pour aborder la qualité germinative du blé. Ainsi, une étude bibliographique à été réalisée pour montrer le degré d'implication des Trxs *h* dans les qualités du blé que ce soit la qualité germinative ou la qualité technologique, cette étude à fait l'objet d'un article « Thioredoxin *h* system and wheat seed quality ». Elle a permis de montré le rôle central des Trxs *h* dans les qualités du blé, et ainsi de poser les bases de notre travail de recherche.

Dans une première étape, il s'agira d'intégrer la dualité maturation/germination dans la compréhension du rôle des rédoxines dans le grain. Comme cela a dejà été fait pour le rôle des Trxs chloroplastiques, dans les modifications de l'état redox induise par la dualité jour/nuit. La caractréisation de nouvelles rédoxines serait un bon moyen pour comprendre les qualités du blé. Ainsi, nous avons criblé les banques EST du blé pour d'abord relever la complexité en termes de Trxs *h*, Grx et Prx, mais aussi pour choisir des éléments susceptibles de renforcer notre système modèle en fonction de leur complémentarité possible.

Dans une deuxième étape, il s'agira, par une étude in vitro, de déterminer les propriétés biochimique des éléments du modèle afin d'en déterminer leurs particularités en tant que marqueurs de la germination et du stress oxydatif au niveau de la jeune plantule.

Dans une troisième étape, il s'agira enfin de moduler l'expression des marqueurs *in planta* par inhibition et par surexpression de leur gène respectif afin de valider leur rôle dans le processus germinatif et le contrôle du stress et par là, la validation du modèle comme système permettant une meilleure compréhension de la physiologie de la semence en vue de son adaptation aux besoins écologiques et économiques.

Thioredoxin h system and wheat seed quality

A Zahid, S Afoulous and R Cazalis

Cereal Chemistry. (2008), 85 (6): 799-807

REVIEW

Thioredoxin h System and Wheat Seed Quality

Abderrakib Zahid,[1] Samia Afoulous,[1] and Roland Cazalis[1,2]

ABSTRACT

Thioredoxin is one of the key systems controlling cellular redox balance in all living organisms. Plant thioredoxins are a diverse multigene family divided into two systems, the chloroplastic and the cytoplasmic systems, which are distinguishable by the electron donor and by the enzyme that catalyses thioredoxin reduction. In cereal seed, the thioredoxin (Trx) h system acts in the developing phase, controlling the delivery of compounds during seed filling. Early in the development of the imbibed seed, it promotes the mobilization of storage nitrogen and carbon in the endosperm by inhibiting the inactivators of amylolytic enzyme and by activating a specific serine protease, thiocalsin. During seed maturation and germination, the Trx h system controls oxidative stress in the living tissues, specifically in the scutellum and the aleurone layer, where it accumulates in the nucleus. The overexpression and the suppression of Trx confirm these features and constitute a powerful tool to manage seed quality, due to the large number of Trx h isoforms and to the specific nature of some of them.

Cereal Chem. 85(6):799–807

Wheat seed quality depends on a set of parameters including the structural organization of the storage compounds, the protection of tissues against oxidative stress, (during seed desiccation and germination, or grain filling), and the activation of the metabolism of seed cells upon imbibition. For these processes, redox control is an important determinant. The redox potential of a cellular compartment describes the tendency of the system to gain or lose electrons when new species are introduced. In this respect, thiol/disulfide exchanges are of great importance because they act as regulatory switches for numerous proteins in response to modifications in the cellular compartment redox state. This is the case for the activity of many seed enzymes, storage proteins (Wong et al 1995, 2004), and the antioxidative system.

Among the proteins involved in the redox control, the redoxin family is characterized by the typical motif -CXXC-, in which two cysteines are separated by two other residues (Holmgren 1975; Martin 1995). The major representatives of this redox motif are the thioredoxin-fold proteins, which include thioredoxin (Trx), glutaredoxin (Grx), protein disulfide isomerase, and nucleoredoxin. This motif presents some degree of flexibility because one of the Cys residues can be replaced by threonine or serine (Fomenko and Gladyshev 2003), as suggested by the subgroups of momothiol Grx and Trx. The motif is employed by redox protein for the active site that permits the oxidation, reduction, or isomerization of disulfide bonds of target proteins.

The CXXC motif has been called a rheostat of the active site because changing -XX- dipeptide residues can perturb the reduction potentials and pKa values of the cysteines (Chivers et al 1997). Differences in the redox potential of the motif explain why some of these Trx-related proteins act as reductants while others are oxidants. Recent studies show that the CXXC motif also controls equally the ability of Trx to isomerize disulfides and to interact with reoxidants and folding proteins (Quan et al 2007).

The Trx system is a major antioxidant system that responds to the cellular redox state. Plants possess two Trx systems, each one characterized by a distinct enzyme that catalyzes the reduction of the Trx and of the electron donor. The first system has been traditionally located in the chloroplast involved in carbon metabolism and oxidative regulation. In the light phase, electrons from the electron transfer chain of the photosystem I reduce ferredoxin. Ferredoxins transfer the electrons to Trx f and m through the ferreodoxin-Trx reductase. Trx controls photosynthesis activities by transferring these reducing equivalents to a target protein such as fructose-1,6-bisphosphatase (Jacquot et al 1978). Trx contributes to regulation of photosynthetic metabolism in promoting the reduction and dissociation of the supramolecular complex such as that of glyceraldehyde-3-phosphate, the regulatory peptide CP12, and phosphoribulokinase and, equally, the dissociation of A_8B_8-glyceraldehyde-3-phosphate hexadecamers regulated by C-terminal extension (Wedel et al 1997; Trost et al 2006). A third mode of regulation could be by channeling metabolite substrates (Buchanan and Balmer 2005; Lemaire et al 2007; Schürmann and Buchanan 2008). Recent studies isolated two others, lower abundant Trx x and y (Lemaire et al 2003; Gelhaye et al 2005; Meyer et al 2005, 2006) with respect to f and m. Furthermore, Trx is involved in a complex interplay with other redox regulators such as peroxiredoxin (Prx), Grx, or glutathione (GSH), which is involved in glutathionylation, a posttranslational modification controlled by Grx. The second system, named Trx h (for heterotrophic), is localized in the cytosol, the endoplasmic reticulum, and the nucleus. Another Trx system, named Trx o, is also present in mitochondria (Laloi et al 2001; Reichheld et al 2005).

Therefore, Trxs are ubiquitous proteins with a molecular mass of 12–14 kDa, and with a characteristic structural motif of 4 α helixes surrounding a five-stand β sheet in a βαβαβαββα topology (Jeng et al 1994; Weichsel et al 1996; Capitani et al 2000). Their conserved redox active site, consisting of the WC[G/P]C sequence, is located at the periphery of the protein. The reduction of the active center is accompanied by structural changes, including an increase in the distance between the two sulfur molecules and a rotation of the side chain of the N-terminal cysteine (Jeng et al 1994; Qin et al 1994).

TRX h SYSTEM

In contrast to the chloroplastic Trx system, the reduction of Trx h (Fig. 1) depends on NADPH and is catalyzed by NADPH-Trx reductase (NTR) (Jacquot et al 1994; Schürmann and Jacquot 2000; Williams et al 2000). NTR belongs to a superfamily of flavoprotein disulfide oxidoreductase. It catalyses the transfer of electrons from NADPH, through FAD and a redox-active disulfide with the motif CAVC, to the active-site disulfide bridge of oxidized Trx h (Mustacich and Powis 2000). NTR from plants consists of a homodimer, with each subunit of 35 kDa containing a FAD and an NADP-binding domain. There is one case of direct reduction of one Trx h through the GSH/Grx system (Gelhaye et al 2003), which

[1] Université de Toulouse–Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Laboratoire d'Agrophysiologie, UPSP/DGER 115, 75 voie du Toec, BP 57611, 31076 Toulouse cedex 03, France.
[2] Corresponding author. Phone: 33-561152989. Fax: 33-561153060. E-mail address: roland.cazalis@purpan.fr

doi:10.1094/CCHEM-85-6-0799
© 2008 AACC International, Inc.

opens up the possibility that other interactions of this kind exist. Recent work on *Arabidopsis* using T-DNA insertion mutants of NTR show that these enzymes play important roles in plant development programs, including pollen fitness and seed development. The knockout mutant with no NTR function is viable and fertile with a wrinkled seed phenotype, slower plant growth, and pollen with reduced fitness. This indicates that, in contrast with mammals, plants can have an alternative mechanism for Trx reduction, at least in *Arabidopsis* (Reichheld et al 2007).

Multiple Trx h and NTR isoforms have been found in plants, leading us to deduce a certain complexity of the NTR-Trx system. In wheat (*Triticum aestivum*), five Trx h systems (Gautier et al 1998; Serrato et al 2001; Cazalis et al 2006) and one NTR (Serrato et al 2002) have been described. In barley (*Hordeum vulgare*), two seed Trx h systems have been characterized (Maeda et al 2003) and two NTR (Shahpiri et al 2008). In *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), eight genes coding Trx h have been identified (Meyer et al 2002, 2005) and three NTR isoforms have been characterized (Serrato et al 2004; Reichheld et al 2005). In rice (*Oryza sativa*), at least nine Trx h systems (Meyer et al 2006; Nuruzzaman et al 2008) have been identified in The Institute for Genomic Research (TIGR) database, as well as two NTR, whose one gene (Os06g22140) with two in-phase methionine codons probably encodes both cytosolic and mitochondrial proteins, like its *Arabidopsis* homologues (Meyer et al 2006). Comparison of databases of *Arabidopsis* and rice genes suggests that the Trx gene family has been greatly expanded and diversified, with several duplications following the divergence between dicots and monocots. However, fewer Trx genes are identified in rice than in *Arabidopsis* (Meyer et al 2006; Nuruzzaman et al 2008).

Plant Trx h has been clustered (Fig. 2) into three groups (Juttner et al 2000; Gelhaye et al 2004a). In any case, most of the sequence variations found between the different Trx h isoforms occur in the N-terminal and C-terminal parts. Members of the first group are supposed to be cytosolic and are found in the phloem sieve. According to Ishiwatari et al (1998), because these proteins do not have a signal peptide, contrary to Trx f and m, when synthesized in the companion cell, they show the capacity to mediate their own cell-to-cell transport through plasmodesmata to the sieve tube. Some motifs found in rice protein, such as MAAEE and RKDD in the N-terminal and C-terminal domain, respectively, seem critical for this cell-to-cell movement. Members of the second group exhibit an extended hydrophobic N-terminal domain, the significance of which remains to be elucidated. Nevertheless, some data suggest that it could be membrane bound (Shi and Bhattacharyya 1996) or function as a mitochondrial transit peptide (Gelhaye et al 2004b). Juarez-Diaz et al (2006) report that the NaTrx h, ubiquitously expressed in *Nicotiana alata*, is secreted into the extracellular matrix of the transmitting tissue, but the mechanism by which the N-terminal extension promotes the secretion remains to be elucidated. Furthermore, NaTrx h exhibits in vitro specific interactions with S-RNase, which suggests that Trx may be involved in pollen-pistil interaction processes or particularly in an S-Rnase-based self-incompatibility. Other studies had related implication of Trx h in self-incompatibility in *Brassica* spp. interacting with the protein kinase domain of the S-locus receptor (SRK), the female determinant of the S-specificity (Bower et al 1996; Mazzurco et al 2001) inhibiting its auto-phosphorylation (Cabrillac et al 2001). When SRK binds, there is an activation of the kinase activity with the release of the Trx (Schopfer et al 1999). The third group is more complex, containing classical Trx and intermediary Trx-Grx forms with a monocysteinic CXXS active site motif and a Grx-like activity or disulfide isomerase activity (Serrato et al 2008). Phylogenetic analysis suggests a eukaryotic origin for Trx h, f, and o whereas Trx m, x, and y are prokaryotic (Hartman et al 1990; Sahrawy et al 1996; Lemaire et al 2003).

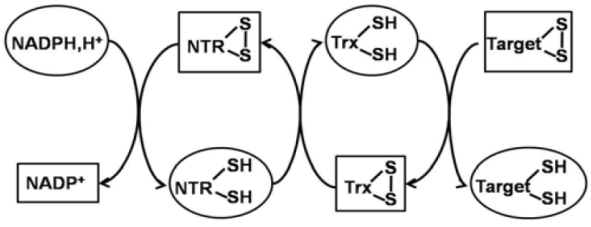


Fig. 1. Schematic of NADPH-thioredoxin (Trx) reductase (NTR)/Trx system. Reduction of plant Trx h is catalyzed by NADPH-thioredoxin reductase using NADPH as a source of reducing equivalents. When Trx disulfide is reduced to a dithiol, Trx h is able to reduce disulfide in target proteins.

SEED DEVELOPMENT AND GERMINATION

Among the redoxins involved in wheat metabolism, Trx h is the thiol/disulfide oxidoreductase whose impact has been the most studied in the multistep process involved in the development, maturation, and germination of the seed. Western blot analysis of the Trx h system in wheat seed shows a wide distribution in most tissues. Trx h accumulates at a high level (Serrato et al 2001) whereas NTR is at low content in seed (Serrato et al 2002). During seed development, Trx h accumulates in maternal tissues, endosperm, and embryo. Immunocytological analysis shows that, during the cellularization phase in the early stage of development

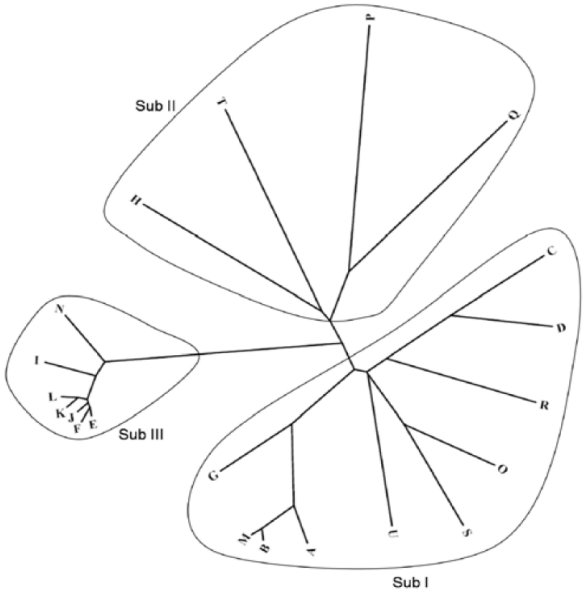


Fig. 2. Phylogenetic tree of thioredoxin (Trx) h from cereals and *Arabidopsis* sources. Phylogenetic tree constructed using CLUSTALW program (www.ebi.ac.uk/ clustalw/) with Trx h sequences searched in National Center for Biotechnology Information and SWISSPROT databases. Trx h are subdivided into three subgroups: sub I, sub II, and sub III. A–N: cereals; O–U: *Arabidopsis*. Accession numbers are A–C: *Triticum aestivum*, AA88O64.1, AAL24517, and 27461140, respectively; D: *Oryza sativa* 426442; E: *Hordeum bulbosum* Q9SWG6; F: *Lolium perenne* Q9SWG4; G–I: *O. sativa* Q9FRT3, Q851R5, and Q8H6X4, respectively; J: *Phalaris coerulescens* Q9S753; K: *Secale cereale* Q9SWG5; L: *Triticum aestivum* Q8H6X0, M: *T. durum* O64395; N: *Zea may* Q8H6X5; O–U: *Arabidopsis thaliana* Q39241, Q9CAS1, Q9XIF4, Q39239, Q42403, Q38879, and P29448, respectively.

(five days after anthesis), Trx h is localized in the entry route of the nutrient, which consists of the vascular tissue and nucellar projection cells (Serrato and Cejudo 2003). In the later stages of development, Trx h accumulates in the entry site for compounds synthesized in plants, consisting of the phloem terminals located at the pedicel. Therefore, there is a clear indication of the implication of Trx h in the control of delivery of compounds into seed (Serrato and Cejudo 2003). Trx h is known to be a common component of the proteins present in the phloem sap (Fisher et al 1992; Sakuth et al 1993; Ishiwatari et al 1995) involved in the redox system.

The suppression of Trx h synthesis by antisense technology (Guo et al 2007) induces a higher glutenin polymers content and decreases the proportion of metabolically active protein fractions in transgenic wheat seeds compared with wild-type ones. These findings indicate that Trx h acts directly or indirectly on the content and solubility of different protein fractions during seed maturation. Trx h intervenes equally on the interaction between proteins of the gluten fraction, materialized by covalent disulfide bond formation during seed maturation, which is directly linked to SDS-unextractable polymeric protein distribution mass (Sherry and Tatham 1997; Rhazi et al 2003).

Trx h has long been known to be involved in the germination of cereals (wheat and barley). Early in the development of the imbibed seed, Trx h inactivates amylolytic enzyme inhibitors and activates thiocalsin, a calcium-dependant substrate, and specific proteases. In the same way, it reduces other protein classes, including the chloroform-methanol proteins (Kobrehel et al 1992; Besse et al 1996; Lozano et al 1996; Yano et al 2001a; Marx et al 2003). All these interactions contribute to initiate the mobilization of nitrogen and carbon in the wheat starchy endosperm, a prerequisite to germination and seedling development (Bewley and Black 1994). Additional experiments show that Trx h changes the properties of the proteins, rendering them more soluble (Wong et al 2004). These data have been confirmed and extended, because overexpressed Trx h in barley endosperm seems to communicate directly with the embryo and the aleurone layer, respectively, to accelerate germination by enhancing activity of starch-debranching enzymes and the appearance of α-amylase, which probably involves gibberellic acid (Cho et al 1999; Wong et al 2002). Conversely, suppression of Trx h in wheat by antisense technology is correlated with a lower germination rate, thereby leading to major protection against preharvest sprouting (Liu et al 2004; Guo et al 2007).

Strategies have been devised to gain more information on the role of Trx h in seeds and other systems by identifying the target proteins. These technologies are based on the mechanism of Trx disulfide reductase activity. The N-terminal cysteine at the active site makes a nucleophilic attack on the target disulfide bond to form an intermolecular mixed-disulfide intermediate, which is then subjected to intramolecular attack from the C-terminal cysteine to release the reduced target protein and the oxidized Trx (Holmgren 1979). To take advantage of this ping-pong mechanism, protein extracts are incubated with reduced Trx. Next, free sulfhydryl groups are labeled with the fluorescent probe monobromobinane. The newly labeled proteins are then separated by conventional two-dimensional electrophoresis, either nonreducing/reducing or isoelectric focusing/reducing SDS-PAGE. The isolated proteins are identified either by amino acid sequencing (Yano et al 2001b) or by proteomics and enzyme assays (Wong et al 2003). The mutant affinity column procedure is an alternative strategy to identify targets of Trx. An intermediate complex formed between a target and Trx can be stabilized when an internal cysteine of the active site of Trx is missing (Verdoucq et al 1999). To this end, a recombinant Trx is mutated by substituting an internal cysteine with serine and immobilizing the Trx mutant on a resin. The target proteins are captured by the Trx mutant through incubation of a crude protein preparation from plant tissue with the resin, to ensure the formation of the mixed-disulfide intermediate. After washing, the trapped proteins are eluted with DTT and identified (Motohashi et al 2001). In addition, confirming the earlier findings of Trx h in regulating protein degradation, Trx h appears to act in the interconversion of fructose-1,6-bisphosphate and fructose-6-phosphate and at diverse points in a modified glycolytic pathway, where some of the enzymes either utilize inorganic pyrophosphate or release it, reflecting the redox state of the endosperm (Wong et al 2003).

Ultimately, the list of Trx targets is growing and includes a large number of thiol-regulated proteins (Balmer et al 2003, 2004; Lemaire et al 2004; Maeda et al 2004, 2005; Wong et al 2004; Yamazaki et al 2004; Alkhalfioui et al 2007). There is a similarity in the set of proteins retrieved with mBBr labeling and that retrieved with affinity column procedures, which indicate that the two approaches are complementary and that, probably, the protein profiles obtained reflect the very target candidates of Trx. However, to avoid false-positive results, these data have to be confirmed with in vivo methodologies. For this, classical yeast two-hybrid methods are used to test the ability of Trx h to complement the different aspects of the phenotype of a yeast mutant strain in which both endogenous Trx genes are inactivated. The use of a monocysteinic Trx as bait allows the stabilization of a disulfide bridge complex with a target and its subsequent identification (Verdoucq et al 1999; Nishiyama et al 1999; Yamanaka et al 2000; Matsumoto et al 2002). Because the standard two-hybrid systems have a low efficiency for revealing Trx target, a new yeast two-hybrid (CY306) has been developed (Vignols et al 2005). This last yeast system was assayed with two *Arabidopsis* Trx h isoforms used as bait, and the results obtained suggest that it constitutes a powerful tool to discriminate Trx targets and is well adapted to reveal low-abundant partners, which remain a drawback with large-scale in vitro proteomics. However, the ideal system for plant Trx remains a validation in planta. Knock-out mutants in Trx h gene lines of *Arabidopsis* collections are available and have been used for this purpose but with limited success so far, probably due to gene redundancy or to compensation mechanisms (Meyer et al 2005). Furthermore, recent data suggest a complex interplay between Trx and Grx, because putative Trx targets seem identical to Grx ones (Rouhier et al 2005; Michelet et al 2006). However, antisense inactivation of the Trx-like CDS32 in potato leads to a hypersensitivity to oxidative stress (Broin and Rey 2003), whereas the inactivation of Trx h in wheat induces a lower germination rate (Guo et al 2007). In these cases, the suppression of a single gene is enough to generate an associated phenotype. These findings suggest that not all of the results found with the *Arabidopsis* model are useful for other plants. Further research using, for example, RNAi strategy or insertion mutagenesis is required to understand the exact biochemical roles and the molecular mechanisms of Trx h proteins in cereal. For this purpose, *Brachypodium distachyon* offers an elegant solution. It is closely related to the Triticeae wheat and barley. Its small genome (≈355 Mbp), whose sequence will soon be available, is equivalent in size to that of *Arabidopsis*, making it the simplest genome described in grasses to date. It exhibits a small physical stature (≈20 cm at maturity), a short lifecycle (less than four months), and few growth requirements. Despite its small stature, *B. distachyon* has large seeds that should prove useful for studies on grain filling (Draper et al 2001).

OXIDATIVE STRESS

All aerobic reactions such as photosynthesis or respiration lead to reactive oxygen species (ROS) production. These ROS, such as superoxide radicals, hydroxyl radicals, or hydrogen peroxide, can damage biological molecules. Furthermore, the rate of ROS production increases with environmental or biotic stresses. Plants developed enzymatic and nonenzymatic systems to protect from

oxidative damage caused by ROS. Trx systems are involved in this protection mechanism by regenerating reduced enzymes.

Seed tissues suffer oxidative stress either through loss of water during maturation or through uptake of water during germination. For this reason, plants have developed mechanisms to protect living tissues, because the corresponding redox status induces an increase in the reduction state of Trx h (Lozano et al 1996; Marx et al 2003; Serrato and Cejudo 2003). Therefore, Trx h appears to act in tissues other than the starchy endosperm and notably in the scutellum and the aleurone layer, tissues that remain alive in mature seed and have to develop mechanisms for tolerance to desiccation. Nuclear immunolocalization of Trx h has been predominantly detected in both aleurone and scutellum cells at later stages of seed development (Serrato and Cejudo 2003) and in germinating seeds (Serrato et al 2001). Among the many protein targets of Trx h from *Medicago truncatula* seed, Alkhalfiou et al (2007) have identified two related nuclear proteins, a Ran and a Ran-binding protein. Ran is a small GTP-binding protein involved in nuclear transport, mitotic spindle formation, and nuclear envelope assembly (Quimby and Dasso 2003). It is localized in the nucleus and the cytosol in GTP-bound and GDP-bound forms, respectively. These findings open up possibilities for understanding the relationship between the nuclear localization of Trx h and its function in seed tolerance to desiccation because Trx h is devoid of a nuclear localization signal.

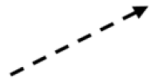
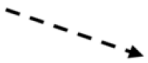
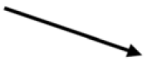
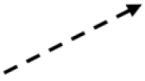
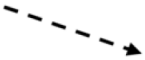
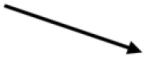
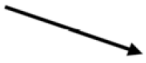
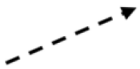
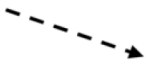
Analysis of the expression of Trx h genes in wheat seeds and seedlings under abiotic stress shows a difference in the expression profile in the aleurone compared with other tissues (Cazalis et al 2006). The aleurone layer stores a large amount of lipids in oleosomes used as the source of energy for metabolic activation upon imbibition. Beakdown of storage lipids generates hydrogen peroxide and other hydroperoxydes fatty acids that can cause damage to cell membranes. Trx h can protect cell components by serving as an electron donor for some Prx. These redoxins reduce H_2O_2 using a thiol and are subsequently reactivated by Trx or Grx. Some of them are located in the chloroplast (2-Cys Prx, glu-

TABLE I
Synthesis of Expected Effects of Thioredoxin (Trx) h Used as Ingredient According to the Literature[a]

Effect	In Vitro effect of Trx h Used as Ingredient
Allergenicity of starchy endosperm protein fractions (a)	–
Improving the quality of cereal products, dough and baked goods (b)	+
Mitigation of allergenicity of raw milk (c)	+
Solubility of sputum mucus (d)	+
Allergenicity of added Trx h (e)	+

[a] Signs + and – indicate an increase or a decrease, respectively. Authors of every effect are indicated by letters. (a), Buchanan et al 1997; (b), Wong et al 1993 and Buchanan et al 2000; (c), Buchanan et al 2000; (d), Rancourt et al 2004; and (e), Weichel et al 2006; there is a controversy on the last point (see Buchanan and Frick 2007).

TABLE II
Synthesis of Expected Effects on Seed Quality of Overexpression or Suppression of Thioredoxin (Trx) h

	Expression of Trx h in Planta[a]	
Effect on Seed Quality[b]	Overexpression	Suppression
Seed development (a)		
UPP molecular mass (b)		
Desiccation tolerance (c)		
Susceptibility to pre-harvest sprouting (b)		
Germination rate (d)		
Oxidative stress control (c)		

[a] Dotted line arrow is an extrapolation, starting from the role of Trx h as defined in wild-type cultivars. Wheat seed quality is the result of the balance of various parameters, including the different development seed phases (growth, desiccation, and germination), the state of the storage molecules (SDS-unextractable polymeric proteins [UPP] content and starch), and the activity level of the metabolic proteins, especially those modulated by Trx h and controlling the developmental stages assuring protection against environmental stress (antioxidative system, protease, amylase, inhibitor, and so on). Depending on the Trx h isoform and its expression level, seed quality could be diversely affected. Overexpression could be favorable (arrow up) for general seed development and desiccation tolerance through better control of oxidative stress. Equally, overexpression of Trx h could promote (arrow up) germination rate and preharvest sprouting; the former contributes to germination quality but the latter damages technological quality. However, a wheat seed overexpressing Trx h could disfavor (arrow down) UPP molecular mass and content, which would have a negative effect on technological quality. Suppression of Trx h by antisense or RNAi technology could induce the inverse effect with respect to the previously described.

[b] Authors of every effect are indicated by a letters. (a), Serrato et al 2001, 2002, and Serrato and Cejudo 2003; (b), Liu et al 2004 and Guo et al 2007; (c), Lozano et al 1996; Marx et al 2003; and Serrato and Cejudo 2003; and (d), Cho et al 1999 and Wong et al 2003.

tathione peroxidase, PrxII, and Prx Q) and are reduced by chloroplastic Trx. The cytosolic or mitochondrial form of glutathione peroxidase is reduced by Trx h (Verdoucq et al 1999; Rouhier et al 2001; Navrot et al 2006), whereas the 1-Cy Prx, which is specifically located in seed tissue, does not seem respond to Trx but to ascorbate (Monteiro et al 2007). Trx h seems to be equally involved in the reduction of methionine sulfoxide reductases, an enzyme which reverses methionine oxidation as a consequence of oxidative stresses (Rouhier et al 2006, 2007; Vieira et al 2007).

The discovery of a Trx h in mitochondria (Florencio et al 1988), in addition to the Trx o form, suggests that additional Trx may exist in this organelle. A potential target of this Trx h is the oxidase of the alternative respiratory pathway. This suggests that Trx h could play a determining role in activation of the alternative oxidase and ROS detoxification (Gelhaye et al 2004b). All these data point out that Trx h systems play a critical role in protection against the damaging effects of ROS in seed and seedlings.

PERSPECTIVES

Trx h can efficiently reduce disulphide bonds and solubilize a great variety of proteins. Pioneering works of Wong et al (1993) show that the Trx h system added to poor-quality flour strengthens the dough as determined by farinograph measurements and increases loaf volume and viscoelasticity. These findings result from the specificity of Trx h for glutenins and other protein families of bread wheat. Similar results had not been obtained with reductants such as glutathione and dithiothreitol because of their lack of specificity. By extension, other works show that the addition of the Trx h system to flour from rice, corn, or sorghum leads to the formation of a limited dough matrix and the beginnings of a leavened loaf because flour from other cereals cannot be used to make a leavened product (Buchanan et al 2000). If this ingredient could be obtained at a cost that is economically profitable, it would represent another source of reducing agents to improve dough-handling properties (Table I). Until now, it seems that the transgenic approach remains the most viable, by choosing a precise Trx system with a suitable expression level to control bread properties affected by changes in wheat quality between crops (Jourdier et al 2005). Because of the increasing demand for cereal products, similar approaches could be developed to improve the quality of cereal flour otherwise unsuitable for breadmaking.

Applied to the starchy endosperm of wheat seed fractions, the Trx h system reduces proteins fractions. This result is accompanied by a statistically significant decrease in allergenicity of the active proteins (Buchanan et al 1997). A similar effect is observed in raw milk, resulting in the mitigation of its allergenicity (Del Val et al 1999). Some controversies appeared recently about the extent to which Trx h could alleviate the allergic response. Weichel et al (2006) present IgE-binding evidence, obtained with patient sera, that a recombinant Trx from wheat and maize is a member of a family of genes related to baker's asthma. The results suggest that other Trx systems also fall into this category, such as maize chloroplast and human types. According to Buchanan and Frick (2007), Trx alleviates the allergic response, and no evidence was found that Trx acted as an allergen. Further investigations are necessary to elucidate concerns about the concentration of Trx protein necessary for sensitization and for the induction of an allergenic response.

In the same paradigm, Rancourt et al (2004) showed that reduction by Trx h induces a drastic increase in the solubility of high molecular weight glycoproteins and causes redistribution of extracellular DNA into the liquid phase of cystic fibrosis sputum. As native mammalian and cereal reductants, Trx systems offer possible alternatives for future medicinal treatments of sputem patients and for production of hypoallergenic dough products (Table I).

The coexistence of multiple Trx h isoforms is still enigmatic, and little is known about the respective roles in the whole redox network of the cytosol, endoplasmic reticulum, or mitochondria. In this respect, working with three isoforms of Trx h found in wheat seed, we show that, as well as being differently expressed, they exhibit a highly contrasted biochemical behavior in vitro (Cazalis et al 2006). Analysis of the interaction of these Trx h isoforms with gliadin and glutenin protein fractions confirms the reductase properties. Furthermore, the lower molecular mass Trx h, which is characterized by an additional cysteine residue in the N-terminal domain of the protein upstream of the very typical active site, was able to catalyze the formation of a high molecular weight protein network by reducing and cross-linking gliadin and glutenin subunits through the additional cysteine residue. Western blot analysis confirms that the formation of these high molecular weight polymers was primarily due to the presence of this Trx h in the protein network (Zahid et al 2008). These primary findings highlight the necessity of characterizing Trx h isoforms individually on the basis of location in vivo and on the basis of the charged and hydrophobic residues from the protein surface, which are determinating for the binding capacity. Electrostatic complementarity is considered to be a major driving force for the rapid association of electron donors and acceptor proteins into complexes (Crowley and Carrondo 2004). Furthermore, in Trx, the hydrophobic and electrostatic states of the solvent-exposed residues forming a groove next to the active site are of particular importance. In this respect, crystal structures of the two barley Trx h isoforms, HvTrxh1 and HvTrxh2, have been determined recently (Maeda et al 2008), allowing the first three-dimensional structure comparison of two Trx h isoforms sharing 51% sequence identity and coexisting in barley seeds but varying in temporal and spatial distribution (Maeda et al 2003). HvTrxh1 and HvTrxh2 are crystallized as a tetramer and a dimer, respectively. Because the dithiol/disulfide exchange reaction between Trx and a target requires a close approximation of the Trx active site and a cysteine target of the substrate protein, the association features of the HvTrxh1 dimer interfaces can serve as a model for the Trx-substrate interaction. The dimer interface analyzed exhibits several van der Waals interactions and three intermolecular backbone-backbone hydrogen bonds, in an antiparallel β-sheet-like arrangement, similar to the arrangement observed in the structure of an engineered, covalently bound complex between Trx and a substrate protein, as reported by Maeda et al (2006). Furthermore, the presence of an intermolecular salt bridge between Glu80 of the bound loop segment and Arg101 near the hydrophobic groove suggests that this last amino acid residue can play a particularly crucial role in the association of HvTrxh1 with target proteins by forming electrostatic interactions with a protein motif bound in the substrate-binding loop motif. Indeed, the protein-protein interactions found in HvTrxh1 are absent in the HvTrxh2 crystal, and the HvTrxh1 Arg101 residue is substituted with the uncharged Ile107 in HvTrxh2. These results suggest that charge complementarity between Trx and a substrate protein plays a role in the specificity of Trx. Finally, we have to keep in mind that Trx can interact independently of its active site (Holmgren et al 1978; Saitoh et al 1998; Berndt et al 2008; Maeda et al 2008). Analysis underlines the possibility of protein-protein association between the substrate-binding motif and Trx, not involving a dithiol/disulfide exchange. These findings must be taken in account, especially when in vitro procedures are used to analyze Trx specificity because the technology can modify the microstructure of the protein and induce false-positive results.

The works previously related (Guo et al 2007; Zahid et al 2008) underline the ambivalence of Trx h in the sense that it can reduce or oxidize sulfhydryl groups. This is particularly so for the Trx h class, which is involved in the modulation of high molecular weight polymer formation by reducing or cross-linking glutenin subunits. These findings can open up fine-tuned biotechnological perspectives for the modulation of polymers related to technological flour quality or gluten properties management during

kneading. However, a balance must be found in modulating Trx h gene expression in wheat seed because of the possible antagonistic interests between technological quality and germinating quality (Table II). If an overexpression of Trx h in endosperm can enhance germinating qualities, it could foster preharvest sprouting at the same time. Conversely, if suppression of Trx h can limit preharvest sprouting prevalence, it could reduce germinating qualities by modifying polymer aggregates and, thus, reduce the storage molecule mobilization rate. The ambivalence of specific Trx h systems could be used to reach such a balance in planta. There are a large number of Trx h isoforms, which raises the question of whether they have specific or redundant functions. Detailed studies show evidence of the specificity of some isoforms (Juarez-Diaz and al 2006; Cazalis et al 2006; Traverso et al 2007). Future work could take advantage of these particularities when expressing the Trx system in transgenic plants.

Some data suggest that Trx f and m might not be restricted to green tissues (Häberlin et al 1995; Mestre-Ortega and Meyer 1999; Pagano et al 2000; Collin et al 2004). Balmer et al (2006a,b) identified a complete ferredoxin-Trx system in amyloplasts from wheat starchy endosperm that involved ferredoxin, ferredoxin-NADP reductase, and ferredoxin-Trx reductase. Furthermore, recent works provide strong evidence of unexpected localization of Trx f and Trx m in nonphotosynthetic tissues of pea (*Pisum sativum* L. cv. Lincoln) such as roots, vascular system, seed, and pollen (Barajas-Lopez et al 2007; Traverso et al 2008). Similarly, a rice Trx m (Os04g44830) promoter-driven green fluorescent protein was found expressed in those tissues (Nuruzzaman et al 2008). In heterotrophic tissues, Trx f and Trx m might be involved in the redox control of cell proliferation during growth. These data open the possibility of new roles for Trx f and m apart from the traditional functions. Because of the central role of amyloplast in endosperm development, analyzing the specific function of these proteins in seed tissues in this new context will certainly contribute to a better understanding of seed physiology.

CONCLUSIONS

Trx h proteins are basically involved in two main physiological roles in cereal seed tissues. The first concerns the reduction of disulfide bonds of protein targets, and this can be highlighted in vitro by the means of molecular labeling procedures, as has been undertaken in pioneering works. This reductase activity leads to activation or inhibition of protein targets or in the solubilization of storage molecules during germination. Second, Trx h is involved in the protection against ROS, generated by the reactivation of metabolism and by other stresses. Some Trx h isoforms are ambivalent oxydoreductases and may be involved in cross-linking of protein targets. As a general framework, Trx h could respond to the redox status of the endosperm, sensing in that way the developing or desiccating and the desiccating or germinating status in a quite similar manner to chloroplastic Trx isoforms, which sense the different light or dark and O_2 or ROS status. The recent discovery of a ferredoxin-Trx system in amyloplast opens up new perspectives on the importance of this organelle in seed physiology. In this framework, Trx appears as a redox key, connecting a number of complex signaling networks in plants.

LITERATURE CITED

Alkhalfioui, F., Renard, M., Vensel, W. H., Wong, J., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Buchanan, B. B., and Montrichard, F. 2007. Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. Plant Physiol. 144:1559-1579.

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

Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Schürmann, P., and Buchanan, B. B. 2004. Proteomics uncovers proteins interacting electrostatically with thioredoxin in chloroplasts. Photosynth. Res. 79:275-280.

Balmer, Y., Vensel, W. H., Cai, N., Manieri, W., Schürmann, P., Hurkman, W. J., and Buchanan, B. B. 2006a. A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:2988-2993.

Balmer, Y., Vensel, W. H., Dupont, F. M., Buchanan, B. B., and Hurkman, W. J. 2006b. Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability. J. Exp. Bot. 57:1591-1602.

Barajas-López, J. D., Serrato, A. J. Olmedilla, A., Chueca, A., and Sahrawy, M. 2007. Localization in roots and flowers of pea chloroplastic thioredoxin f and thioredoxin m proteins reveals new roles in nonphotosynthetic organs. Plant Physiol. 145:946-960.

Berndt, C., Lillig, C. H., and Holmgren, A. 2008. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. BBA 1783:641-650.

Besse, I., Wong, J. H., Kobrehel, K., and Buchanan, B. B. 1996. Thiocalsin: A thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3169-3175.

Bewley, J. D., and Black, M. 1994. Seeds. Physiology and Germination. Plenum Press: New York.

Broin, M., and Rey, P. 2003. Potato plants lacking the cdsp32 plastidic thioredoxin exhibit overoxidation of the bas1 2-cysteine peroxiredoxin and increased lipid peroxidation in thylakoids under photooxidative stress. Plant Physiol. 132:1335-1343.

Bower, M. S., Matias, D. D., Fernandes-Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Gu, T., Rothstein, S., and Goring, D. R. 1996. Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica* S locus receptor kinase. Plant Cell 8:1641-1650.

Buchanan, B. B., and Balmer, Y. 2005. Redox regulation: A broadening horizon. Annu. Rev. Plant Biol. 56:187-220.

Buchanan, B. B., and Frick, O. L. 2007. Thioredoxin and food allergy J. Allergy Clin. Immunol. 119:513-514.

Buchanan, B. B., Adamidi, C., Lozano, R. M., Yee, B. C., Momma, M., Kobrehel, K., Ermel, R., and Frick, O. L. 1997. Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5372-5377.

Buchanan, B. B., Kobrehel, K., Yee, B. C., Wong, J. H., Lozano, R., Jiao, J., and Shin, S. 2000. Use of thiol redox proteins for reducing protein intramolecular disulfide bonds, for improving the quality of cereal products, dough and baked goods and for inactivating snake, bee and scorpion toxins. US patent 6113951.

Cabrillac, D., Cock, J. M., Dumas, C., and Gaude, T. 2001. The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. Nature 410:220-223.

Capitani, G., Markovi-Housley, Z., DelVal, G., Morris, M., Jansonius, J. N., and Schürmann, P. 2000. Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts J. Mol. Biol. 302:135-154.

Cazalis, R., Pulido, P., Aussenac, T., Pérez-Ruiz, J. M., and Cejudo, F. J. 2006. Cloning and characterization of three thioredoxin h isoforms from wheat showing differential expression in seeds. J. Exp. Bot. 57:2165-2172.

Chivers, P. T., Prehoda, K. E., and Raines, R. T. 1997. The CXXC motif: a rheostat in the active site. Biochemistry 36:4061-4066.

Cho, M.-J, Wong, J. H., Marx, C., Jiang, W., Lemaux, P. G., and Buchanan, B. B. 1999. Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:14641-14646.

Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knav, D. B., Dietz, K. J., and Issakidis-Bourguet, E. 2004. Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new y type. Plant Physiol. 136:4088-4095.

Crowley, P. B., and Carrondo, M. A. 2004. The architecture of the binding site in redox protein complexes: Implications for fast dissociation. Proteins 55:603-612.

Del Val, G., Yee, B. C., Lozano, R. M., Buchanan, B. B., Ermel, R. W., Lee, Y.-M., and Frick, O. L. 1999. Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of milk. J. Allergy Clin. Immunol. 103:690-669.

Draper, J., Mur, L. A. J., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G. C., Bablak, P., Hasterok, R., and Routledge, A. P. M. 2001. *Brachypodium distachyon*: A new model system for functional genomics in grasses. Plant Physiol. 127:1539-1555.

Fisher, D. B., Wu, Y., and Ku, M. S. 1992. Turnover of soluble proteins in the wheat tube sieve. Plant Physiol. 100:349-356.

Florencio, F. J., Yee, B. C., Johnson, T. C., and Buchanan, B. B. 1988. An NADP/thioredoxin system in leaves: Purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin h from spinach. Arch. Biochem. Biophys. 266:496-507.

Fomenko, D. E., and Gladyshev, V. N. 2003. Identity and functions of CxxC-derived motifs. Biochemistry 42:11214-11225.

Gautier, M.-F., Lullien-Pellerin, V., de Lamotte-Guéry, F., Guirao, A., and Joudrier, P. 1998. Characterization of wheat thioredoxin h cDNA and production of an active *Triticum aestivum* protein in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 252:314-324.

Gelhaye, E., Rouhier N., and Jacquot, J.-P. 2003. Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. FEBS Lett. 555:443-448.

Gelhaye, E., Rouhier, N., and Jacquot, J.-P. 2004a. The thioredoxin h system of higher plants. Plant Physiol. Biochem. 42:265-271.

Gelhaye, E., Rouhier, N., Gérard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P. I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y., and Jacquot, J.-P. 2004b. A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:14545-14550.

Gelhaye, E., Rouhier, N., Navrot, N., and Jacquot, J.-P. 2005. The plant thioredoxin system. Cell. Mol. Life Sci. 62:24-35.

Guo, H. X., Yin, J., Ren, J. P., Wang, Z. Y., and Chen, H. L. 2007. Changes in proteins within germinating seeds of transgenic wheat with an antisense construct directed against the thioredoxin. J. Plant Physiol. Mol. Biol. 33:18-24.

Häberlein, I., Wolf, M., Mohr, L., and Follmann, H. 1995. Differentiation of six distinct thioredoxins in seeds of soybean. J. Plant Physiol. 146:385-392.

Hartman, H., Syvanen, M., and Buchanan, B. B. 1990. Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxins f and m. Mol. Biol. Evol. 7:247-254.

Holmgren, A. 1979. Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. J. Biol. Chem. 254:9113-9119.

Holmgren, A., Söderberg, B. O., Eklund, H., and Bränden, C. I. 1975. Three dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Angström resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:2305-2309.

Holmgren, A., Ohlsson, I., and Grankvist, M. L. 1978. Thioredoxin from *Escherichia coli*. Radioimmunological and enzymatic determinations in wild type cells and mutants defective in phage T7 DNA replication. J. Biol. Chem. 253:430-436.

Ishiwatari, Y., Honda, C., Kawashima, I., Nakamura, S., Hirano, H., Mori, S., Fijowara, T., Hayashi, H., and Chino, M. 1995. Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. Planta 195:456-463.

Ishiwatari, Y., Fijiwara, T., McFarland, K. C., Nemoto, K., Hayashi, H,. Chino, M., and Lucas, W. J. 1998. Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. Planta 205:12-22.

Jacquot, J. P., Vidal, J., Gadal, P., and Schürmann, P.1978. Evidence for the existence of several enzyme-specific thioredoxins in plants. FEBS Lett. 94:243-246.

Jacquot, J. P., Rivera-Madrid, R., Marinho, P., Kollarova, M., Le Maréchal, P., Miginiac-Maslow, M., and Meyer, Y. 1994. *Arabidopsis thaliana* NADPH thioredoxin reductase. cDNA characterization and expression of the recombinant protein in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 235:1357-1363.

Jeng, M. F., Campbell, A. P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D. A., Wright, P. E., and Dyson, H. J. 1994. High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin. Structure 2:853-868.

Joudrier, P., Gautier, M. F., de Lamotte, F., and Kobrehel, K. 2005. The thioredoxin systems :potential applications. Biotechnol. Adv. 23:81-85.

Juarez-Diaz, J. A., McClure, B., Vazquez-Santana, S., Guevara-Garcia, A., Leon-Mejia, P., Marquez-Guzman, J., and Cruz-Garcia, F. 2006. A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana alata* and reduces S-RNase in vitro. J. Biol. Chem. 281:3418-3424.

Juttner, J., Olde, D., Langridge, P., and Baumann, U. 2000. Cloning and expression of a distinct subclass of plant thioredoxins. Eur. J. Biochem. 267:7109-7117.

Kobrehel, K., Wong, J. H., Balogh, A., Kiss, F., Yee, B. C., and Buchanan, B. B. 1992. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. Plant Physiol. 99:919-924.

Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J. M., and Bonnard, G., Meyer, Y. 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:14144-14149.

Lemaire, S. D., Collin, V., Keryer, E., Quesada, A. L., and Miginiac-Maslow, M. 2003 Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Lett. 543:87-92.

Lemaire, S. D., Guillon, B., Le Marechal, P., Keryer, E., Miginiac-Maslow, M., and Decottignies, P. 2004. New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:7475-7480.

Lemaire, S. D., Michelet, L., ZaVagnini, M., Massot, V., and Issakidis-Bourguet, E. 2007. Thioredoxins in chloroplasts. Curr. Genet. 51:343-365.

Liu, L., Yin, J., Ren, J. P., and Han, J. F., 2004. Effects of antisense *trxs* on germination of transgenic wheat seeds. Acta Agron. Sin. 30:801-805.

Lozano, R. M., Wong, J. H., Yee, B. C., Peters, A., Kobrehel, K., and Buchanan, B. B. 1996. New evidence for a role for thioredoxin h in germination and seedling development. Planta 200:100-106.

Maeda, K., Finnie, C., Ostergaard, O., and Svensson, B. 2003. Identification, cloning and characterization of two thioredoxin h isoforms, HvTrx h1 and HvTrx h2, from barley seed proteome. Eur. J. Biochem. 270:2633-2643.

Maeda, K., Finnie, C., and Svensson, B. 2004. Cy5 maleimide labelling for sensitive detection of free thiols in native protein extracts: Identification of seed proteins targeted by barley thioredoxin h isoforms. Biochem. J. 378:497-507.

Maeda, K., Finnie, C., and Svensson, B. 2005. Identification of thioredoxin h reducible disulphides in proteomes by differential labelling of cysteines: Insight into recognition and regulation of proteins in barley seeds by thioredoxin h. Proteomics 5:1634-1644.

Maeda, K., Hägglund, P., Finnie, C., Svensson, B., and Henriksen, A. 2006. Structural basis for target protein recognition by the protein disulfide reductase thioredoxin. Structure 14:1701-1710.

Maeda, K., Hägglund, P., Finnie, C., Svensson, B., and Henriksen, A. 2008. Crystal structures of barley thioredoxin h isoforms HvTrxh1 andHvTrxh2 reveal features involved in protein recognition and possibly in discriminating the isoform specificity. Protein Sci. 17:1015-1024.

Martin, J. L. 1995. Thioredoxin: A fold for all reasons. Structure 3:245-250.

Marx, C., Wong, J. H., and Buchanan, B. B. 2003. Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. Planta 216:454-460.

Matsumoto, K., Masutani, H., Nishiyama, A., Hashimoto, S., Gon, Y., Horie, T., and Yodoi, J. 2002. C-propeptide region of human pro alpha 1 type 1 collagen interacts with thioredoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 295:663-667.

Mazzurco, M., Sulaman, W., Elina, H., Cock, J. M., and Goring, D. R. 2001. Identification of a cysteine required for the interaction of two thioredoxin h proteins with the kinase domain of the S locus receptor kinase. Plant Mol. Biol. 45:365-376.

Mestre-Ortega, D., and Meyer, Y. 1999. The *Arabidopsis thaliana* genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. Gene 240:7109-7117.

Meyer, Y., Vignols, F., and Reichheld, J. P. 2002. Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. Methods Enzymol. 347:394-402.

Meyer, Y., Reichheld, J.-P., and Vignols, F. 2005. Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. Photosynth. Res. 86:419-433.

Meyer, Y., Riondet, C., Constans, L., Abdelgawwad, M. R., Reichheld, J.-P., and Vignols, F. 2006. Evolution of redoxin genes in the green lineage. Photosynth. Res. 89:179-192.

Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Keryer, E., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E., and Lemaire, S. D. 2006. Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: New crosstalks to explore. Photosynth. Res. 89:225-245.

Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O., and Netto, L. E. S. 2007. Reduction of 1-cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin c, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:4886-4891.

Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M. T., and Hisabori, T. 2001. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:11224-11229.

Mustacich, D., and Powis, G. 2000. Thioredoxin reductase. Biochem. J.

346:1-8.
Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D. B., Issakidis, E., Jacquot, J.-P., and Rouhier, N. 2006. Plant glutathione peroxidase are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. Plant Physiol. 142:1364-1379.
Nishiyama, A., Matsui, M., Iwata, S., Hirota, K., Masutani, H., Nakamura, H., Takagi, Y., Sono, H., Gon, Y., and Junji Yodoi, J. 1999. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D_3 up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression J. Biol. Chem. 274:21645-21650.
Nuruzzaman, M., Gupta, M., Zhang, C., Wang, L., Xie, W., Xiong, L., Zhang, Q., and Lian, X. 2008. Sequence and expression analysis of the thioredoxin protein gene family in rice. Mol. Genet. Genomics 280:139-151.
Pagano, E. A., Chueca, A., and Lopez-Gorge, J. 2000. Expression of thioredoxins f and m, and of their targets fructose-1,6-bisphosphatase and NADP-malate dehydrogenase, in pea plants grown under normal and light/temperature stress conditions. J. Exp. Bot. 51:1299-1307.
Qin, J., Clore, G. M., and Gronenborn, A. M. 1994. The high-resolution three-dimensional solution structures of the oxidized and reduced states of human thioredoxin. Structure 2:503-522.
Quan, S., Schneider, I., Pan, J., Von Hacht, I., and Bardwell, J. C. A. 2007. The CXXC motif is more than a redox rheostat. J. Bio. Chem. 282:28823-28833.
Quimby, B. B., and Dasso, M. 2003. The small GTPase ran: Interpreting the signs. Curr. Opin. Cell. Biol. 15:338-344.
Rancourt, R. C., Tai, S., King, M., Heltshe, S. L., Penvari, C., Accurso, F. J., and White, C. W. 2004. Thioredoxin liquefies and decreases the viscoelasticity of cystic fibrosis sputum. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 286:L931-L938.
Reichheld, J. P., Meyer, E., Khafif, M., Bonnard, G., and Meyer, Y. 2005. AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 579:337-342.
Reichheld, J.-P., Khafif, M., Riondet, C., Droux, M., Bonnard, G., and Meyer, Y. 2007. Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. Plant Cell 19:1851-1865.
Rhazi, L., Cazalis, R., and Aussenac, Y. 2003. Sulfhydryl-disulfide changes in storage proteins of developing wheat grain; influence on the SDS-unextractable glutenin polymer formation. J. Cereal Sci. 38:3-13.
Rouhier, N., Gelhaye, E., Sautiere, P. E., Brun, A., Laurent, P., Tagu, D., Gerard, J., de Faÿ, E., Meyer, Y., and Jacquot, J. P. 2001. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve a tube that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. Plant Physiol. 127:1299-1309.
Rouhier, N., Villarejo, A., Srivastav, M., Gelhaye, E., Keech, O., Droux, M., Finkemeier, I., Samuelsson, G., Dietz, K. J., Jacquot, J. P., and Wingsle, G. 2005. Identification of plant glutaredoxin targets. Antioxid. Redox Signal. 7:919-929.
Rouhier, N., Vieira Dos Santos, C., Tarrago, L., and Rey, P. 2006. Plant methionine sulfoxide reductase a and b multigenic families, Photosynth. Res. 89:247-262.
Rouhier, N., Kauffmann, B., Tete-Favier, F., Palladino, P., Gans, P., Branlant, G., Jacquot, J., and Boschi-Muller, S. 2007. Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type a methionine sulfoxide reductases, J. Biol. Chem. 282:3367-3378.
Sahrawy, M., Hecht, V., López-Jaramillo, J., Chueca, A., Chartier, Y., and Meyer, Y. 1996. Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. J. Mol. Evol. 42:422-431.
Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. 1998. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. EMBO J. 17:2596-2606.
Sakuth, T., Schobert, C., Pecsvaradi, A., Eichholz, A., Komor, E., and Orlich, G. 1993. Specific proteins in the sieve tube exudates of *Ricinus communis* L. seedlings: Separation, characterization and in vivo labeling. Planta 91:207-213.
Schopfer, C. R., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. Science 286:1697-1700.
Schürmann, P., and Buchanan, B. B. 2008. The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. ARS 10:1235-1274.
Schürmann, P., and Jacquot, J.-P. 2000. Plant thioredoxin systems revisited. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51:371-400.
Serrato, A. J., and Cejudo, F. J. 2003. Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. Planta 217:392-399.
Serrato, A. J., Crespo, J. L., Florencio, F. J., and Cejudo, F. J. 2001. Characterization of two thioredoxins h with predominant localization in the nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. Plant Mol. Biol. 46:361-371.
Serrato, A. J., Pérez-Ruiz, J. M., and Cejudo, F. J. 2002. Cloning of thioredoxin h reductase and characterization of the thioredoxin reductase-thioredoxin h system from wheat. Biochem. J. 367:491-497.
Serrato, A. J., Pérez-Ruiz, J. M., Spínola, M. C., and Cejudo, F. J. 2004. A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 279:43821-43827.
Serrato, A. J., Guilleminot, J., Meyer, Y., and Florence Vignols, F. 2008. AtCXXS: Atypical members of the *Arabidopsis thaliana* thioredoxin h family with a remarkably high disulfide isomerase activity. Physiol. Plant. 133:611-622.
Shahpiri, A., Svensson, B., and Finnie, C. 2008. The NADPH-dependent thioredoxin reductase/thioredoxin system in germinating barley seeds: Gene expression, protein profiles, and interactions between isoforms of thioredoxin h and thioredoxin reductase. Plant Physiol. 146:789-799.
Shewry, P. R., and Tatham, A. S. 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. J. Cereal Sci. 25:207-227.
Shi, J., and. Bhattacharyya, M. K. 1996. A novel plasma membrane-bound thioredoxin from soybean. Plant Mol. Biol. 32:653-662.
Traverso, J. A., Vignols, F., Cazalis, R., Pulido, A., Sahrawy, M., Cejudo, F. J., Meyer, Y., and Chueca, A. 2007. PsTRXh1 and PsTRXh2 are both pea h-type thioredoxins with antagonistic behavior in redox imbalances. Plant Physiol. 143:300-311.
Traverso, J. A., Vignols, F., Cazalis, R., Serrato, A. J., Pulido, P., Sahrawy, M., Meyer, Y., Cejudo, F. J., and Chueca, A. 2008. Immunocytochemical localization of *Pisum sativum* TRXs f and m in non-photosynthetic tissues J. Exp. Bot. 59:1267-1277.
Trost, P., Fermani, S., Marri, L., Zaffagnini, M., Falini, G., Scagliarini, S., Pupillo, P., and Sparla, F. 2006. Thioredoxin-dependent regulation of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: autonomous vs. CP12-dependent mechanisms. Photosynth. Res. 89:263-275.
Verdoucq, L., Vignols, F., Jacquot, J. P., Hartier, Y., and Meyer, Y.1999. In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. J. Biol. Chem. 274:19714-19722.
Vieira Dos Santos, C., Laugier, E., Tarrago, L., Massot, V., Issakidis-Bourguet, E., Rouhier, N., and Rey, P. 2007. Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of *Arabidopsis* plastidial methionine sulfoxide reductases b. FEBS Lett. 581:4371-4376.
Vignols, F., Bréhélin, C., Surdin-Kerjan, Y., Thomas, D., and Meyer, Y. 2005. A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:16729-16734.
Wedel, N., Soll, J., and Paap, B. K. 1997. CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10479-10484.
Weichel, M., Glaser, A. G., Ballmer-Weber, B. K., Schmid-Grendelmeier, P., and Crameri, R. 2006. Wheat and maize thioredoxins: A novel cross-reactive cereal allergen family related to baker's asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 117:676-681.
Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G., and Montfort, W. R. 1996. Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. Structure 4:735-751.
Williams, C. H., Arscott, L. D., Müller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P.-F., Veine, D. M., Becker, K., and Schirmer, R. H. 2000. Thioredoxin reductase. Two modes of catalysis have evolved. Eur. J. Biochem. 267:6110-6117.
Wong, J. H., Kobrehel, K., Nimbona, C., Yee, B. C., Balogh, A., Kiss, F., and Buchanan, B. B. 1993. Thioredoxin and bread wheat. Cereal Chem. 70:113-114.
Wong, J. H., Jiao, J.-A., Kobrehel, K., and Buchanan, B. B. 1995. Thioredoxin-dependent deinhibition of pullulanase of barley malt by inactivation of a specific inhibitor protein. Plant Physiol. 108:67.
Wong, J. H., Kim, Y. B., Ren, P.-S., Cai, N., Cho, M.-J., Heden, P., Lemaux, P. G., and Buchanan, B. B. 2002. Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence of communication between the endosperm and the embryo and aleurone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:16325-16330.

Wong, J. H., Balmer, Y., Cai, N., Tanaka, C. K., Vensel, W. H., Hurkman, W. J., and Buchanan, B. B. 2003. Unraveling thioredoxin linked metabolic processes of cereal starchy endosperm using proteomics. FEBS Lett. 547:151-156.

Wong, J. H., Cai, N., Tanaka, C. K., Vensel, W. H., Hurkman, W. J., and Buchanan, B. B. 2004. Thioredoxin reduction alters the solubility of proteins of wheat starchy endosperm: An early event in cereal germination. Plant Cell Physiol. 45:407-415.

Yamanaka, H., Maehira, F., Oshiro, M., Asato, T., Yanagawa, Y., Takei, H., and Nakashima, Y. 2000. A possible interaction of thioredoxin with VDUP1 in HeLa cells detected in a yeast two-hybrid system Biochem. Biophys. Res. Commun. 271:796-800.

Yamazaki, D., Motohashi, K., Kasama, T., Hara, Y., and Hisabori, T. 2004. Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell. Physiol. 45:18-27.

Yano, H., Wong, J. H., Cho, M.-J., and Buchanan, B. B. 2001a. Redox changes accompanying the degradation of seed storage proteins in germinating rice. Plant Cell Physiol. 42:879-883.

Yano, H., Wong, J. H., Lee, Y. M., Cho, M.-J., and Buchanan, B. B. 2001b. A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:4794-4799.

Zahid, A., Gabarrou, J.-F., and Cazalis, R. 2008. Reducing and cross-linking wheat seed storage proteins with thioredoxin h. In: Consumer Driven Cereal Innovation: Where Science Meets Industry. ICC: Vienna.

[Received June 26, 2008. Accepted August 12, 2008.]

Conclusion et perspective

Ces premières réflexions sur les Trxs *h* soulignent l'importance de la prise en compte de la dualité maturation/germination dans la compréhension même de la qualité du grain. Celle-ci se vérifie par l'existence d'un certain antagonisme entre qualité technologique et qualité semencière. La modulation de l'expression d'une Trx *h* ne fait que mettre en évidence cette réalité. Ceci confirme notre intuition que s'il convient de moduler l'expression de Trx *h* *in planta* pour en saisir la latitude de leur rôle, le choix de ladite Trx *h* doit être minutieux. Le criblage de banques d'EST et le choix d'éléments particuliers répondront à cette exigence. Enfin, ce qui a été mis en évidence chez les Trxs *h* doit être également analysé chez les autres rédoxines du grain.

Partie IV

Résultats

CRIBLAGE DES REDOXINES DU BLE

A ce jour, le système modèle utilisé par le laboratoire est constitué de trois isoformes de Trxs *h* notées Trx *h*1, *h*2 et *h*3 (Cazalis et al., 2006), d'un isoforme de Grx et un isoforme de Prx de type 1-Cys-Prx. Dans l'optique d'une meilleure prise en compte de ces protéines dans les processus de germination, il importe en premier d'analyser leur complexité afin de renforcer adéquatement le modèle initial par de nouveaux isoformes. Cette opération est grandement facilitée par l'existence de banques d'EST, le génome du blé n'ayant pas encore été séquencé. En outre, la relative petite taille de ces gènes font que le fragment séquencé est susceptible de recouvrir une bonne part de la partie 3' du gène, ce qui est généralement suffisant pour connaître la séquence codante du même.

Le criblage correspond à la recherche d'une séquence dans une banque de données d'ADNc, constituée d'un grand nombre de séquences inconnues. Elles ont en commun l'utilisation d'une séquence homologue à une partie de la séquence recherchée. Ainsi, pour rechercher des rédoxines dans une banque de données, on utilise comme repère des séquences des rédoxines connues, qui permettent de rechercher des nouveaux isoformes avec des caractéristiques différentes.

Afin de permettre d'isoler différentes isformes de rédoxines, nous procédons à une recherche de protéines dans des banques de données d'ADNc, avec une première banque constituée à partir de blé de la variété soissons, et une banque de données disponible sur internet sur le site de la «United States Department of Agriculture» (USDA), contenant différentes séquences d'ADN provenant de blé dont le blé (http:/wheat.pw.usda.gov/NSF/).

1 Matériels et méthodes

1.1 *Criblage de banque EST du blé*

Pour chaque rédoxine du système modèle, une séquence de référence a été utilisée pour analyser les banques EST du blé. Les séquences ont été téléchargées du site de l'USDA (http:/wheat.pw.usda.gov/NSF/curator/quality/), afin de trouver des séquences d'homologie proche de la séquence de référence. La banque de données ainsi constituée, elle permet la recherche de séquences génétiques codant pour des protéines d'intérêt. La banque a été analysée grâce au logiciel BLAST disponible sur le site de la NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) installé localement. Une fois les clones d'intérêts déterminés,

les séquences protéiques ont été déduites *in silico*, via les ressources du site bioweb2.pasteur.fr. L'étude s'est poursuivie par la détermination de la structure tridimensionnelle des protéines putatives par homologie moléculaire. Les modèles et leur analyse ont été réalisés par la suite de logiciels « Deep-View » (http:/www.exasy.org/spdbv/). Un code couleur permet de visualiser les potentiels électrostatiques mis en évidence par le logiciel « Deep-View » : le rouge représentent l'électronégativité, le blanc la neutralité et le bleu l'électropositivité. Le potentiel électrostatique est important à prendre en compte puisqu'il conditionne le comportement des protéines vis-à-vis des molécules de leur milieu. Il permet donc de prédire le comportement des rédoxines vis-à-vis de leurs protéines cibles.

1.2 *Criblage de l'ADNc Soissons*

Les extractions d'ARN ont été effectuées sur des graines « Soissons » germées en présence de condition de stress salin et de stress oxydatif provoqué par le peroxyde d'hydrogène, dans le but de moduler l'expression de transcrits de la famille des rédoxines chez les plantules de blé. Après extraction des ARN des différents organes grâce au «RNeasy plant Mini Kit» (Qiagen), une banque d'ADNc obtenue par transcription inverse a été constituée, à partir de laquelle des séquences d'intérêts ont été isolées par PCR grâce à des amorces bien déterminées selon le type de rédoxine ciblé. Le produit PCR est analysé par gel d'agarose, ensuite les bandes sont extraites à l'aide du «MiniElute Gel Extraction Kit» (Giagen). Les bandes ainsi identifiées ont été clonées dans le vecteur pGEMT (Promega) puis séquencées (Société commerciale). Dans le but de produire des protéines recombinantes, les constructions « ADNc-His tag » ont été réalisées et clonées dans le vecteur pET16b (Promega) afin d'être exprimées en système hétérologue (*E .coli BL21*). Les protéines des rédoxines obtenues sont purifiées par chromatographie sur des colonnes NTA, suivant le protocole fourni avec le kit Ni-NTA Spin Kit (Qiagen).

2 Résultats et discussion

2.1 *Résultats des recherches de Trx h dans les banques EST*

L'alignement EST des Trxs (Figure 9) montre l'ensemble des Trx repérées par criblage dans les bases de données. Un grand nombre de Trx ont été identifiés et peuvent être

regroupés en trois classes: les protéines proches de Trx *h*1, les protéines proches de Trx *h*2 et les protéines proches de Trx *h*3. Ce classement peut se faire par observation des parties N terminales des protéines: La partie N terminale de la Trx *h*2 commence par MAASAATATA, la partie N-terminale de la Trx *h*1 commence par MAAEE et la partie N-terminale de la Trx *h*3 commence par MAAAATAT. Parmi les Trx du premier alignement, nous avons repéré les protéines présentant des différences remarquables par rapport aux Trx *h*1, *h*2 et *h*3. Les Protéines sélectionnées sont notées Trx *h*4, *h*5, *h*6, *h*7 et *h*8 dans un souci de simplification.

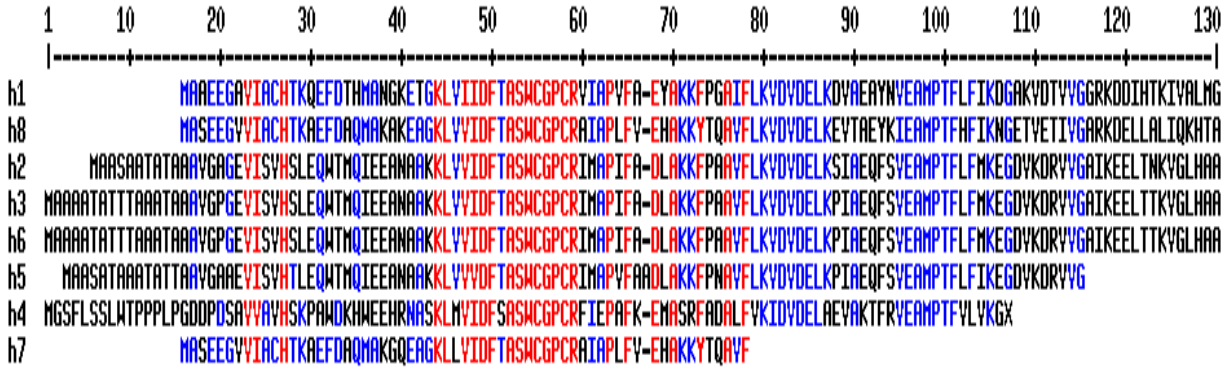


Figure 9 : Alignement des séquences protéiques des Trxs *h* obtenues après Criblage des banques EST des Trxs *h* en utilisant la Trx *h*1, 2 et 3 comme séquences de références. L'alignement a été réalisé avec le logiciel Multalin.

Après alignement et observation des séquences de Trx isolées, celles qui présentent des particularités ont été sélectionnées et alignées avec les séquences de *h*1, *h*2 et *h*3 déjà connues. Sur l'alignement (Figure 9) on peut observer le site actif WCGPC de Trx. On observe également à la partie N-terminale la méthionine, premier acide aminé des protéines qui se situe entre le n° 1 et 20 du graphique. L'observation de ces séquences permet de repérer des variations entre acides aminés de la chaîne polypeptidique, dans la partie N-terminale des protéines. On observe par exemple une nette différence entre la partie N-terminale de Trx *h*4 et la partie N-terminale des autres protéines. La Trx *h*8 quant à elle ressemble à la Trx *h*1 mais le troisième acide aminé correspond à une sérine (MAS) là où chez la Trx *h*2, il correspond à une alanine (MAA). Une légère variation comme celle-ci au niveau de la chaîne primaire peut avoir des conséquences importantes au niveau de localisation cellulaire de la protéine.

L'arbre phylogénétique (Figure 10) Permet de visualiser les écarts entre les protéines sélectionnées.

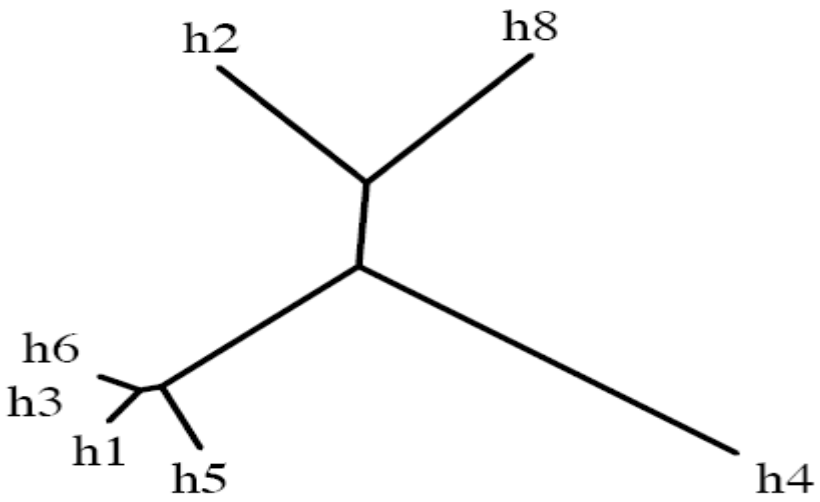


Figure 10 : L'arbre phylogénétique des Trx *h* du blé réalisé avec le logiciel ClustalW2 (http://clustalW.genome.ad.jp)

Cet arbre met en évidence la présence de trois groupes de protéines: Trx *h*1, Trx *h*5, Trx *h*3 et Trx *h*6 ont toutes des structures primaires très similaires. Les différences qui peuvent exister entre ces protéines sont ponctuelles et concernent majoritairement les domaines N et C-terminaux de la chaîne polypeptidique. Elles peuvent néanmoins s'avérer importante si les acides aminés qui diffèrent présentent des rôles structurels ou fonctionnels particuliers. La présence d'une cystéine par exemple peut transformer la fonction d'une protéine de par la formation de ponts disulfure. Le deuxième groupe comprend la Trx *h*2 et la Trx *h*8. Celles-ci présentent plus de différences entre elles. Pour finir, on observe que la Trx *h*4 est séparée des autres protéines, formant un « groupe » à elle seule. Cela signifie que sa chaîne polypeptidique diffère substantiellement de celle des autres protéines. Etant donné les ressemblances entre les Trx *h* 5, 6, 7 et 8 avec les Trx *h* de références (Trx *h*1, 2 et 3), seule la Trx *h*4 présentant des différences majeures à cause de son extrémité N-terminale a été retenue et ajoutée à notre système modèle. Ainsi notre système modèle est constitué de la Trx *h*1, 2, 3 et 4. La Figure 11 montre l'alignement des séquences protéiques des quatre Trxs *h*.

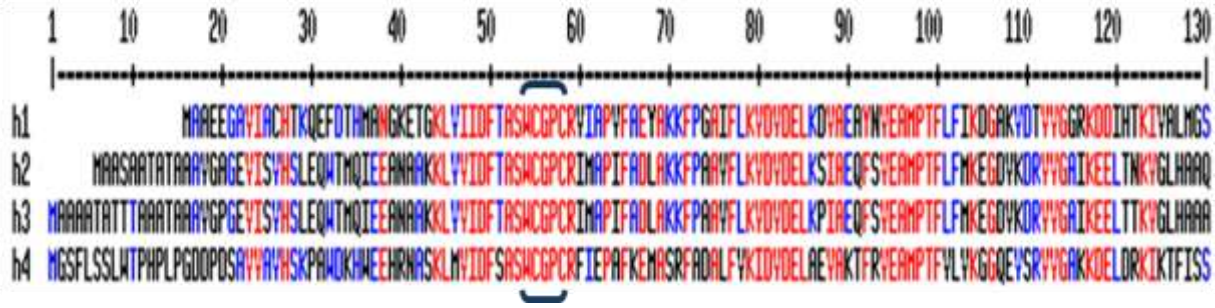


Figure 11 : Alignement des séquences protéiques des 4 Trx *h*. L'alignement a été réalisé avec le logiciel Multalin.

2.2 Comparaison de la Trx h4 avec la Trx h2 standard.

Comparons les structures secondaires de la Trx *h*4 avec la Trx *h*2 (Figure 12). La partie N-terminale de la Trx *h*4 présente une structure très particulière avec la formation «Turn» et «Coil» entre la méthionine et le site actif. Cette différence est due à la présence, dans la partie N-terminale, de trois acides aminés proline successives (PPP), acide aminé d'importantes caractéristiques structurelles. Le reste de la protéine présente des différences moins spectaculaires.



Figure 12 : Structures secondaires des Trx *h*2 et Trx *h*4, obtenues avec le logiciel Granier (Osguthorpe et Robeson, 1978).

Les différences seront plus marquées au niveau de l'hydrophobie et du potentiel électrostatique de la protéine. L'analyse des potentiels électrostatiques (Figure 13), montre que la répartition des charges négatives est très différente sur la Trx *h*4 par rapport à celle sur les autres protéines.

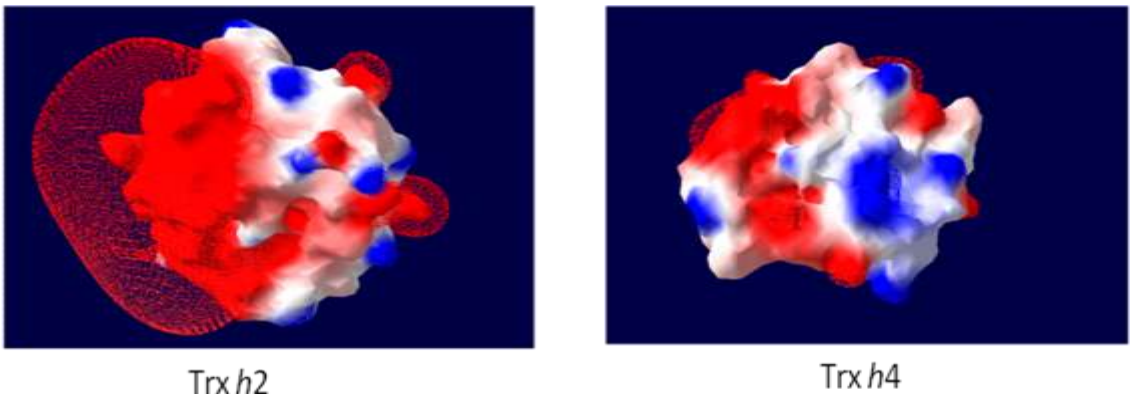


Figure 13 : Potentiels électrostatiques de la Trx *h*2 et *h*4. Ils sont mis en évidence par le logiciel «Deep-View» (Guex et Peitch, 1997), qui permet de visualiser les différences des potentiels électrostatiques grâce à un code couleur, avec la couleur rouge représente l'électronégativité, le blanc la neutralité et le bleu l'électropositivité.

En effet, sur la Trx *h*2 les charges négatives sont concentrées sur un côté de la protéine, constituant un pôle de polarité. Alors que sur la Trx *h*4, les charges négatives sont segmentées et dispersées. Elle n'aura donc pas la même façon d'interagir avec les molécules de son milieu, et donc avec ses protéines cibles. Elle n'aura notamment pas la même attraction vers des molécules chargées négativement. On observe également que toute une partie de la Trx *h*4 est neutre à la différence des autres Trx *h*. Cette zone correspond à la partie très hydrophobe de *h*4. La présence d'une partie neutre hydrophobe sur la protéine est une information qui suggère soit la possibilité d'une protéine membranaire, soit l'existence d'un dimère dans le cas d'une protéine soluble. L'analyse de l'hydrophobicité de l'extrémité N-terminale montre que la Trx *h*4 présente une hydrophobicité plus élévée que la Trx *h*2 et la Trx *h*1 et 3 (Figure 14).

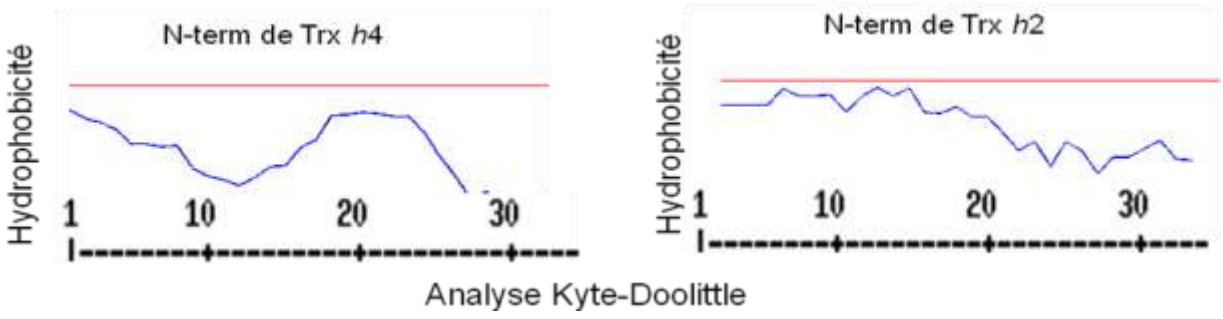


Figure 14 : Analyse de l'hydrophobicité des extrémités N-terminales de la Trx *h*2 et *h*4 (Kyte et Doolittle, 1982).

La Trx *h*4 présente une extrémité N-terminale allongée, et caractérisée par la présence de plusieurs résidus de prolines, et surtout d'un acide aminé de glycine au niveau de la position 2. Meng et al., 2010, ont montré que AtTrx *h*9, possédant une Glycine en position 2 est myristoylée. De plus, cette Glycine est responsable de l'ancrage membranaire de la Trx *h*9, Trx *h* qu'est impliquée dans des communications intercellulaires. L'utilisation d'un programme pour la prédiction (http://ca.expasy.org/tools/mirstoylator), spécifique aux extrémités N-terminales, montre que la Trx *h*4 est positive à la myristoylation.

L'analyse phylogénétique réalisé à partir de séquences protéiques de Trxs *h* de différentes sources (Figure 15), montre que les Trx *h*1, 2 et 3 sont localisées dans le sous-groupe 1, alors que la Trx *h*4 est située dans le sous-groupe 2, groupe spécifique aux Trxs *h* caractérisées par la présence d'une extrémité N-terminale allongée et hydrophobe.

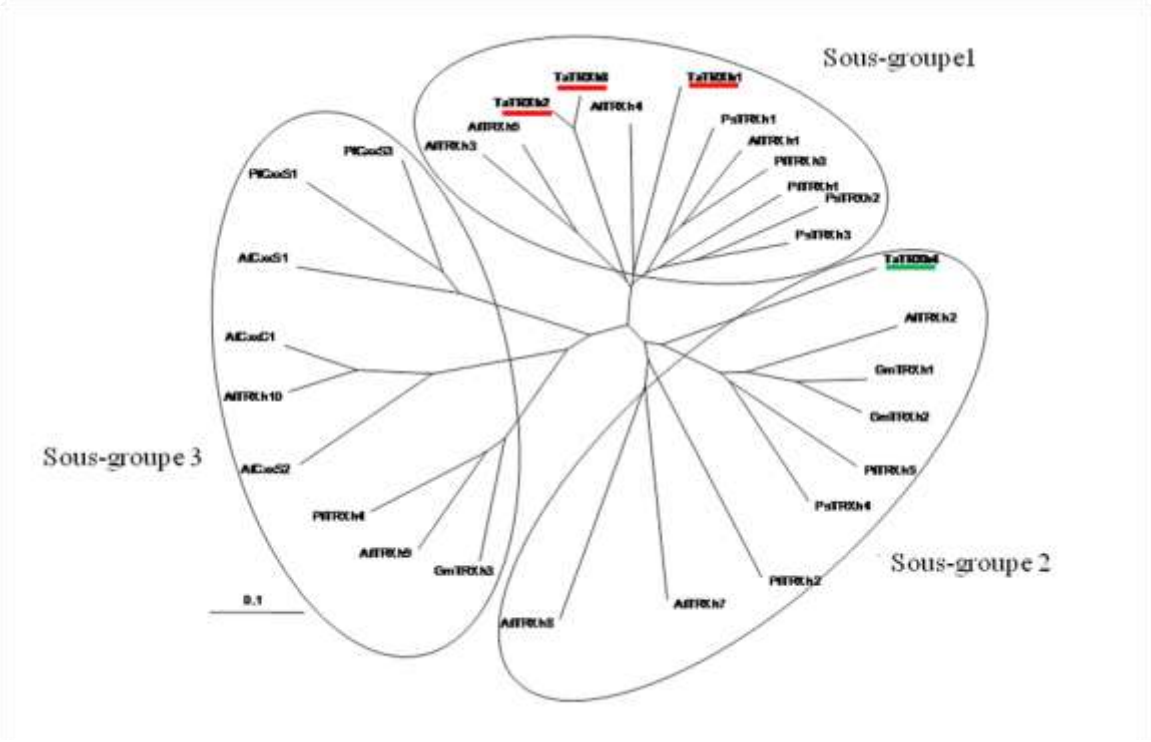


Figure 15 : L'arbre phylogénétique des Trx *h* réalisée avec le logiciel ClustalW2 (http://clustalW.genome.ad.jp) à partir de différentes espèces, At: *Arabidopsis thaliana,* Gm: *Glycine max*, Ps: *Pisum sativum*, Pt: *Popoulus tricocharpa*. Les Trx *h*s ont été classées en trois sous-groupes en fonctions de leurs séquences N et C-terminales. Les Trx *h*1, 2 et 3 du blé (Triticum aestivum) ont été classées dans le sous-groupe 1, alors que la Trx *h*4 est située dans le sous-groupe 2.

2.3 *Résultats des recherches de Grx dans les banques EST*

Quatre gènes de Grxs notées Grx 2, Grx 3, Grx 4 et Grx 5 ont été identifiés par le biais du BLAST dans les banques EST. Les Grxs 3, 4 et 5 proviennent de blé contaminé par la fusariose (*Fusarium graminearum*).

L'alignement de l'ensemble des Grx (Figure 16) montre que les séquences primaires sont très similaires à la séquence de la Grx 1 de référence. On observe le site actif (CPFC) caractéristique du premier groupe de Grx. Les différences observées au niveau de la chaîne polypeptidique sont ponctuelles et peu nombreuses. Elles peuvent néanmoins avoir un impact conséquent sur les structures et les fonctions des protéines. On a notamment au 30ème acide aminé de la chaîne polypeptidique une variation entre la présence de prolines chez les Grxs 1, 2 et 3 et de sérines chez les Grxs 4 et 5. La proline est un acide aminé aux propriétés structurales très intéressantes qui peut changer la conformation d'une protéine.

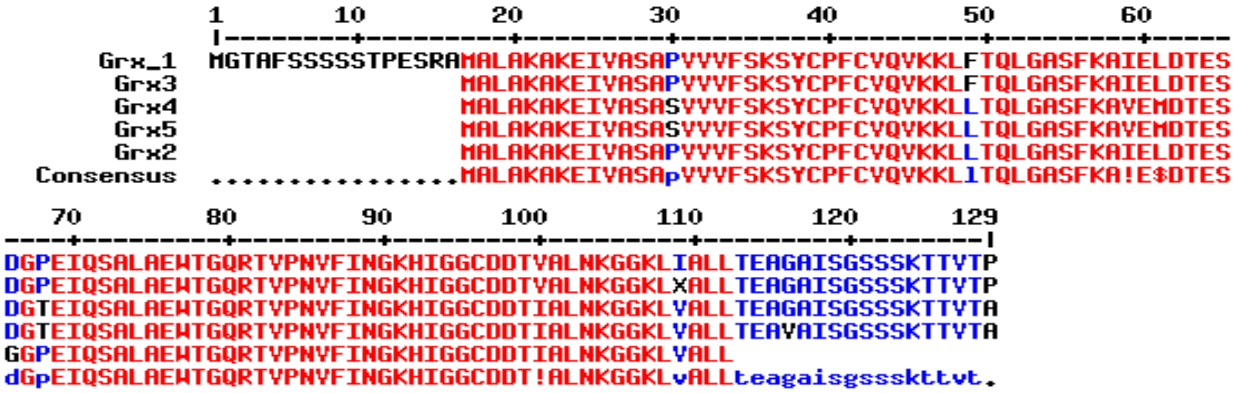


Figure 16 : Alignement des Grxs isolées par screnning EST. Les Grxs 2, 3, 4 et 5 ont été alignées avec la Grx 1 utilisée comme séquence de référence. L'alignement a été réalisé avec le logiciel Multalin.

L'arbre phylogénétique montre des écarts peu important entre les protéines (Figure 17). On observe trois principaux groupes de protéines: la Grx 1 très proche de la Grx 3, la Grx 4 est très proche de la Grx 5 et la Grx 2 se trouve entre les deux groupes.

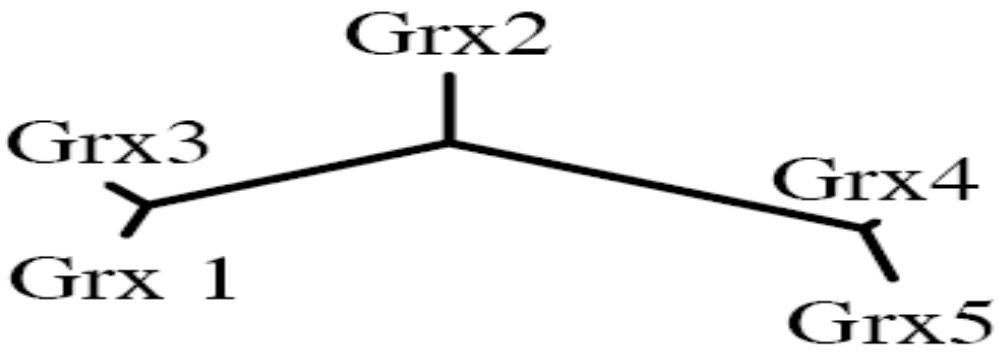


Figure 17 : Arbre phylogénétique des 5 Protéines de Grxs, réalisée sur le site (http://clustalw.genome.ad.jp).

Cependant, l'ensemble de ces Grxs appartiennent au subgroupe I de l'arbre phylogénétique des Grxs (Figure 18). Il s'agit du groupe englobant les isoformes de Grxs caractérisées par les sites actifs classiques de type CPFC, CPYC, CGYC. De même, les analyses des structures secondaires et d'hydropathies, montrent que les différences de structures sont peu nombreuses entre ces Grxs, à part une variation à la partie N-terminale des protéines.

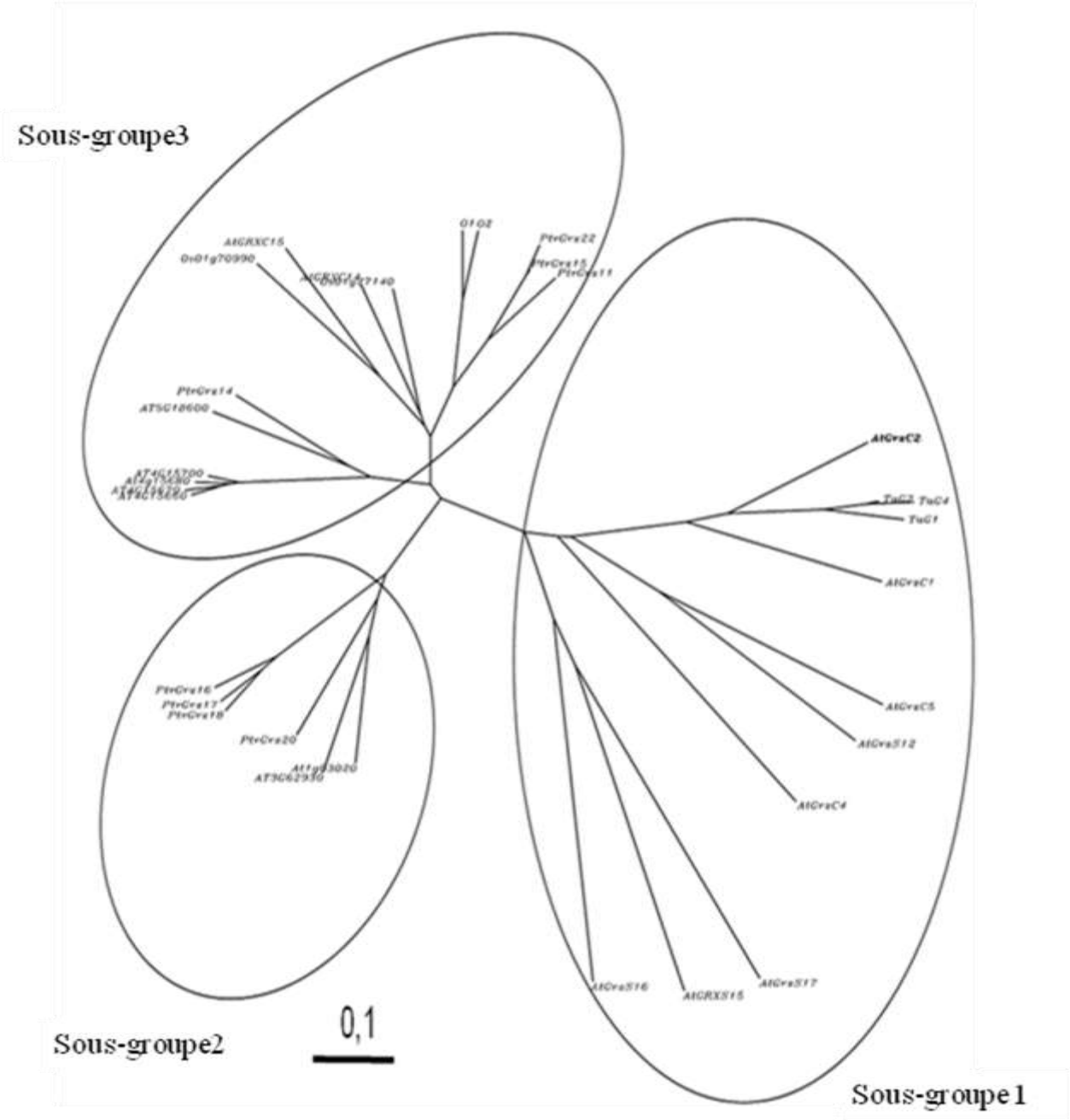


Figure 18 : Arbre phylogénétique des Grxs réalisé à partir de séquences protéiques *d'Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* et *Populus trichocarpa*. L'arbre phylogénétique a été construit avec le logiciel ClustalW (http://clustalw.genome.ad.jp), afin de situer les séquences protéiques TaGrx1, TaGrx2 et TaGrx4 des glutarédoxines de blé tendre (*Triticum aestivum*). Les nombres d'accessions d'*oryza sativa* sont O1, Os01g70990; O2, Os01g27140. Les Grxs du blé tendre sont notées TaG1, TaG2 et TaG4.

2.4 *Résultats des recherches de Prx dans les banques EST*

Peu de Prxs, ont été trouvées par criblage. L'alignement des Prxs (Figure 19) montre les Prxs repérées, avec une Prx 4 présentant beaucoup de ressemblances avec la Prx 1, cependant les différences observables se situent au niveau du fragment de la Prx 2. La comparaison de l'hydropathie ne présente pas de tendance remarquable permettant de les différencier. Après alignement de structure entre la Prx 1 et la Prx 4, on observe une partie des protéines qui présentent des structures homogènes. Il faudra rechercher la partie non homogène pour voir ou se situe les différences de structures.

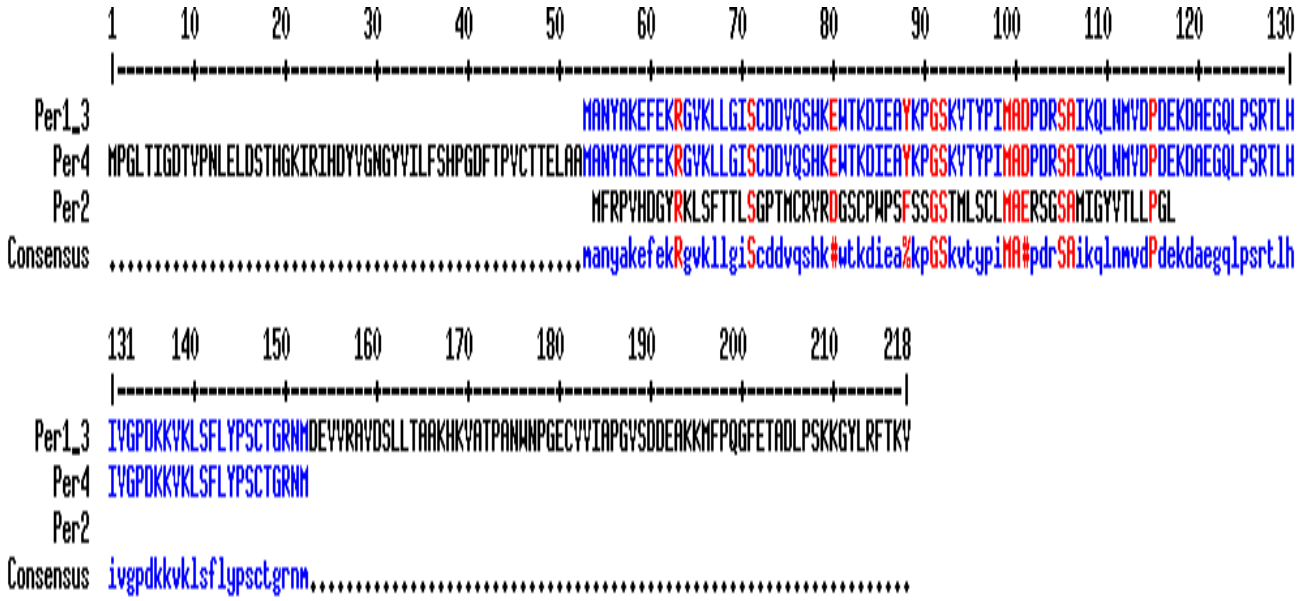


Figure 19 : Alignement des peroxyrédoxines (Per) du groupe II, isolées par screnning EST. Les Per 2 et 4 ont été alignées avec la séquence de référence Per1 par le logiciel multalin

2.5 *Expression des protéines recombinantes*

2.5.1 Matériels et méthodes

Les ADNc des différentes Trx *h*s ont été amplifiés avec des primers spécifiques, qui permettent d'induire des sites de restriction *Nde*I et *Xho*I. Les fragments d'ADNc purifiés, ont été digérés avec les enzymes de restrictions *Nde*I et *Xho*I et clonés dans le vecteur pET16b, produisant les plasmides pET-Trx*h*1, pET-Trx*h*2, pET-Trx*h*3 et pET-Trx*h*4. Les plasmides sont ensuite introduits dans des souches d'*E. Coli BL21,* afin d'être exprimées en système hétérologue (*E .coli BL21*). L'expression des protéines recombinantes est induite par

l'addition de 1 mM d'IPTG pendant 4 heures. Les protéines recombinantes sont purifiées par chromatographie d'affinité, suivant le protocole fourni avec le kit Ni-NTA Spin Kit (Qiagen).

Pour caractériser les propriétés des protéines de la Trx *h*4, puisqu'elle est la seule à être retenue pendant le criblage, l'activité réductrice de cette dernière vis-à-vis de l'insuline en présence du DTT a été réalisée. De même, pour mettre en évidence leurs éventuelles différences structurelles par rapport aux autres Trx *h*s du système modèle, Les protéines recombinantes des différentes Trx *h*s, ont été analysées par western blot à l'aide d'anticorps anti-Trx *h*2 (*pisum sativum*).

2.5.2 Résultats

L'analyse par SDS-Page, montre l'expression des protéines recombinantes des 4 Trx *h*s (Figure 20). Ce résultat visualise les différences de masses moléculaires entre les protéines recombinantes. Les masses moléculaires des Trx *h*1, *h*2, *h*3 et *h*4 déterminées par analyse bioinformatique sont respectivement 12,69, 13,35, 13,74 et 14,60 kDa. Les activités réductrices vis-à-vis de l'insuline, ont permis de montrer que les protéines recombinantes de la Trx *h*4 sont capables aussi de réduire l'insuline (Figure 21), comme montré auparavant pour les Trx *h*1, *h*2 et *h*3 dans les travaux de Cazalis et al., 2006. Cependant, cette activité reste inférieure par rapport à celles des 3 autres Trx*h*s. Les analyses par western blot, ont permis de mettre en évidence des différences structurelles majeures de la Trx *h*4 par rapport aux autres isoformes, puisque l'anticorps-antiTrx *h*2 (*Pisum Sativum*) ne reconnait pas les protéines recombinantes de la Trx *h*4 (Figure 22).

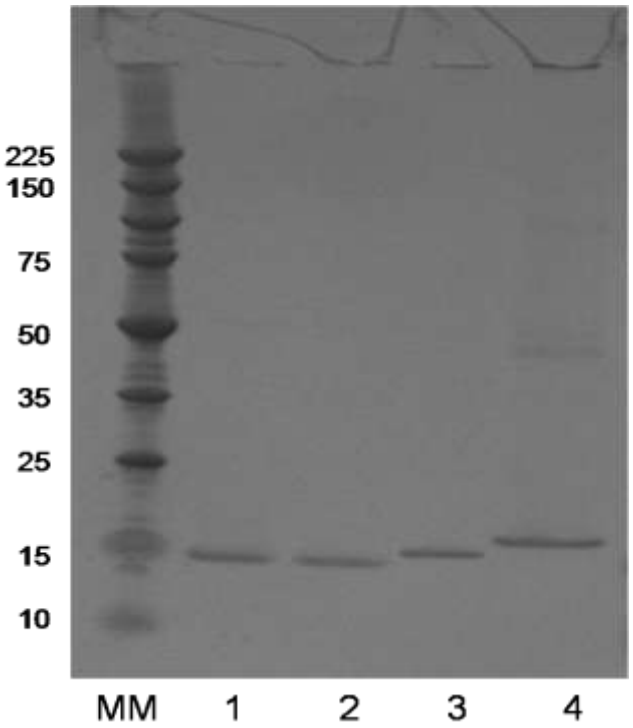


Figure 20 : Après purification, les protéines recombinantes des 4 Trx*h*s ont été analysées par électrophorèse SDS-Page. Le gel est ensuite fixé avec le bleue de coomassie R250. MM : marqueur moléculaire, Les lignes 1, 2, 3 et 4 correspondent respectivement aux Trx *h*1, *h*2, *h*3 et *h*4.

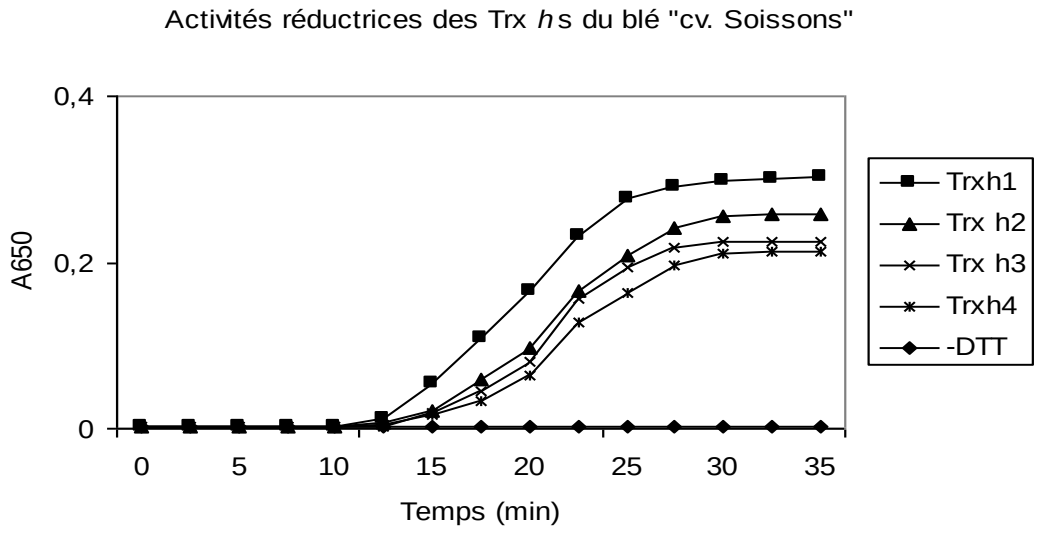


Figure 21 : Test des activités réductrices des Trx *h* du blé. La réduction de l'insuline dépend du DTT impliqué dans l'activation des Trx *h*s. La réduction se fait dans tampon phosphate 100 mM à pH 7.1, contenant 2mM EDTA, 0.5 mg/mL-1, 0.5 mM DTT et 4 µM de chaque Trx *h*. L'absence de DTT (-DTT/Contrôl) ne montre pas d'activité des Trx*h*s.

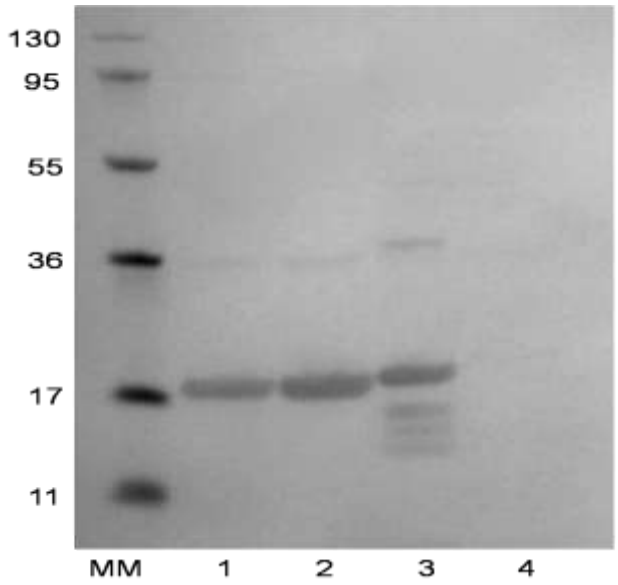


Figure 22 : Détection immunologique des protéines recombinantes des 4 Trx *h*s. Les protéines ont été analysées par électrophorèse SDS-Page. Après transfert, la membrane de nitrocellulose a été incubée avec les anticorps anti-Trx *h*2 (*pisum sativum*). MM : marqueur moléculaire, ligne 1 : Trx *h*1, ligne 2 : Trx *h*2, ligne 3 : Trx *h*3 et ligne 4 : Trx *h*4.

L'ensemble des résultats obtenus pour la Trx *h*4 et particulièrement les analyses par western blot, confirment les données obtenues par les analyses bioinformatiques sur son hydrophobie et son potentiel életrostatique. La Trx *h*4 ne présente pas le même comportement vis-à-vis des molécules de son milieu et donc les protéines cibles in *vivo*. En plus de la Trx *h*1, la Trx *h*4 constitue une candidate dont les études peuvent être approfondies et particulièrement par des modulations de leur expression dans la plante.

Conclusion et perspective

Bien que les banques EST soient moins favorables aux gènes les moins exprimés, elles donnent un niveau d'informations permettant d'initier la recherche. Le criblage des rédoxines a permis de retenir une 4ème Trx *h* (Trx *h*4) sur la base de ses caractéristiques. Pour les mêmes raisons aurait pu être retenu la Trx h8. Cependant, la recherche sur les Grx et les Prx n'ayant pas été exhaustive, elle n'a pas permis de repérer des protéines remarquables pour enrichir le système modèle. Les séquences identifiées ne présentent pas de différences majeures avec celles des séquences de références. Sur cette base, il est permis de passer à l'étape suivante de l'implication des rédoxines dans la physiologie de la semence, par le biais des marqueurs du système modèle.

INTERACTIONS TRX H-PROTEINES DE RESERVE DU BLE (CV SOISSONS)

Une première manière de discriminer les rédoxines en vue de leur utilisation *in planta* consiste à évaluer leurs propriétés quand ces protéines sont mises en interactions avec leurs cibles potentiels dans le grain. En ce qui concerne les Trx *h*, les différentes fractions protéiques de réserve constituent une cible qui peut être utilisée à cet effet. En outre, la littérature souligne que l'addition de Trx *h* à des pâtes soit faiblement panifiables soit impanifiables comme l'est le maïs a pour effet d'améliorer la cohésion de la pâte et par là sa qualité technologique. Ce résultat s'interprétait sur la base des propriétés réductrices des groupes thiols des Trx *h* qui permettaient ainsi une modulation de la conformation des polymères en libérant des groupements thiols oxydés.

REDUCING AND CROSS-LINKING WHEAT SEED STORAGE PROTEINS WITH THIOREDOXIN H

A ZAHID, JF GABARROU AND R CAZALIS

PROCEEDING, ISBN 978-1-891127-61-8.

Reducing and Cross-Linking Wheat Seed Storage Proteins with Thioredoxin *h*

ABDERRAKIB ZAHID[1], JEAN-FRANCOIS GABARROU[2], and ROLAND CAZALIS[1]

[1]Laboratoire d'Agrophysiologie; [2]Département d'Agronomie - EI Purpan, 75 voie du Toec 31076 Toulouse, France

ABSTRACT

Thioredoxin *h* (Trx*h*) is known to be involved in the mobilization of storage proteins during germination since it is able to reduce disulfides bonds. The present work investigates other possibilities of Trx*h*. In vitro interactions between wheat Trx*h* and endosperm protein fractions were analyzed. Trx*h* can reduce an array of soluble proteins. In addition, we were able to unravel Trx*h* activity on the basis of its interaction with the gliadin fraction and propose a relationship between Trx*h* activity and its molecular mass. The differences in molecular mass are mainly due to the N-terminal domain. The most reactive wheat Trx*h*1, with *E. coli* Trx used as reference, was able to release new proteins from the gliadin fraction. Analysis of the interaction of Trx*h* with reduced glutenin subunit fraction shows that Trx*h*1, which is characterized by the presence of a third cysteine residue on the N-terminal domain, could be involved in the formation of high molecular weigh protein network by cross-linking glutenin subunits via the additional cysteine residue. These experiments reveal that certain Trx*h* classes can be able to reduce or oxidize cysteine residues. These Trx*h* characteristics open new biotechnological opportunities.

INTRODUCTION

Thioredoxin *h* (Trx*h*) belongs to the redoxins family of small (12-14 kDa) thermostable proteins with catalytically active disulfide groups. This class of proteins has been found in virtually all organisms, and takes part in a myriad of biochemical pathways (Buchanan et al., 1994). In cereal seed, Trx*h* is well known to be involved in the mobilization of storage proteins during germination (Besse et al., 1996; Kobrehel et al., 1992). Early experiments with wheat provided *in vitro* evidence that Trx*h* facilitated the protein redox changes observed during germination (Kobrehel et al., 1992). Furthermore, an overexpression of Trx*h* in the endosperm enhanced the activity of starch debranching enzyme (Cho et al., 1999) and accelerated the appearance of α-amylase as well as the rate of germination (Wong et al., 2002), whereas partial inhibition of Trx*h* expression by antisense constructs induces a low germination rate and a higher glutenin polymer formation (Guo et al., 2007). To summarize, Trx*h* acts as a

wake-up call in germination and seedling development by catalyzing reductive reactions in the endosperm and acting as a member of a transmembrane communication network that seems to involve gibberellic acid (Buchanan and Balmer, 2005). Trx*h* has been studied mainly under its reductive activity aspects. In this present work, we report that interaction of Trx*h* with wheat endosperm protein fractions show that some classes of Trx*h* can be involved both in reductase activity and protein network formation by cross-linking storage proteins.

MATERIALS AND METHODS

Protein Extraction

Seeds were ground in a M20 mill (IKA-WERKE, Germany) to pass 0.5 mm sieve and an Osborne fractionation was performed on 200 mg meal. Each extraction step was carried out with 1 mL of buffer by mixing vigorously and placing the microfuge tubes on a rotator for 2 hr. Between each fraction, the remaining meal was washed three times with water and the supernatant discarded. Protein fraction F1 was extracted with 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride PMSF (Sigma, USA) buffer. Protein fraction F2 was extracted with 70% (v/v) ethanol. For the extraction of protein fraction F3, the remaining meal was stirred in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.9, 0.1% SDS for 2 hours at room temperature and then allowed to stand at 60°C without additional stirring for 24 hr. Protein solutions were centrifuged (JOUAN MR23i, France) for 5 min at 12,500 *g* at 4°C (F1 and F2) or 20°C for F3. Protein fractions F2 and F3 were concentrated on Ultracel 5K centrifugal filter unit (Millipore, USA) according to the manufacturer's instructions. Following extraction, protein samples were stored at –20°C. Glutenin subunits fraction (F4) was obtained from fresh meal according Fu and Sapirstein (1996).

Wheat (*Triticum aestivum*, cv. Soissons) Trx*h* were obtained as previously described (Cazalis et al., 2006). *E. coli* Trx was purchased from Sigma, USA. Polyclonal antibodies were raised by immunizing hens with purified His-tagged wheat protein at the EI Purpan Laying Hens Experimental Farm and purified by the EggsPure IgY Kit (Agro-Bio, France) according to the manufacturer's instructions.

Protein Interaction

5 mM Trx*h* - previously reduced with 0.25 mM DTT for 15 min in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 - was added to 60 µg protein fraction and incubated for an additional 30 min at 30°C. Monobromobimane (mBBr) labelling was carried out as previously described (Kobrehel et al., 1992) and samples were then applied to gels for electrophoresis. Gels were then placed in 12% (w/v) TCA and soaked for 1 hr and transferred to a 40% methanol/10% acid acetic solution overnight to remove excess mBBr. Fluorescence was visualized under UV light (365 nm). Gels were then stained with Coomassie brilliant blue R-250. For western blot analysis, protein samples were subjected to SDS-PAGE and electrotransferred to a nitrocellulose sheet. Immuno-detection was performed using antibodies raised against Trx*h*1 and high molecular weight glutenin subunit y10 (HMWy10) coupled with rabbit anti-chicken IgY (IgG) (Sigma) and detected with Sigma *Fast*™ BCIP/NBT Tablets (Sigma).

RESULTS, DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Used Trx*h* are characterized by their different molecular masses, 12.67, 13.34 and 13.67 kD for Trx*h*1, Trx*h*2 and Trx*h*2 respectively (Fig. 1). Trx*h*1, in addition to exhibiting a low molecular weight, is characterized by a supplementary cysteine residue (Cys 11) in this domain upstream of the very typical active site WGGPC. Trx*h*2 has a standard profile, whereas Trx*h*3 is characterized by a hydrophobic N-terminal domain and especially by the

fact to appear exclusively in monomeric form, even in absence of a reducing agent such as DTT (Cazalis et al., 2006).

The soluble protein fraction F1 is made of a large range of soluble proteins (Fig. 2B) among which albumins and globulins subunits, but also some high molecular weight (HMW) glutenin subunits which are detected by western blot (result not shown), however the specificity of the antibodies against HMW does not permit to detect low molecular weight glutenin subunits. In vitro, Trx*h* can reduce an array of proteins, and *E. coli* Trx presenting the most important reducing activity (Fig. 2A).

```
       1                                                                  60
  h3   MAAAATATTT AAATAAAVGP GEVISVHSLE QWTMQIEEAN AAKKLVVIDF TASWCGPCRI
  h2   MAASA      ATATAAAVGA GEVISVHSLE QWTMQIEEAN AAKKLVVIDF TASWCGPCRI
  h1   MAA                EE GAVIACHTKQ EFDTHMANGK ETGKLVIIDF TASWCGPCRV
coli   M                      SDKIIHLTDD SFDTDVLKAD GA---ILVDF WAEWCGPCKM

       61                                                                120
  h3   MAPIFADLAK KFPAAVFL-K VDVDELKPIA EQFSVEAMPT FLFMKEGDVK DRVVGAI-KE
  h2   MAPIFADLAK KFPAAVFL-K VDVDELKSIA EQFSVEAMPT FLFMKEGDVK DRVVGAI-KE
  h1   IAPVFAEYAK KFPGAIFL-K VDVDELKDVA EAYNVEAMPT FLFIKDGAKV DTVVGGR-KD
coli   IAPILDEIAD EYQGKLTVAK LNIDQNPGTA PKYGIRGIPT LLLFKNGEVA ATKVGALSKG

       121          135
  h3   ELTTKVGLHA AA
  h2   ELTNKVGLHA AQ
  h1   DIHTKIVALM GSASA
coli   QLKEFLDANL A
```

Fig. 1. Alignment of wheat and *E. coli* Trx. Similar residues are in block letters. The accession numbers are the following: Trx*h*1, AY072771; Trx*h*2, AF286593; Trx*h*3, AF420472; *E. coli*, NP418228.

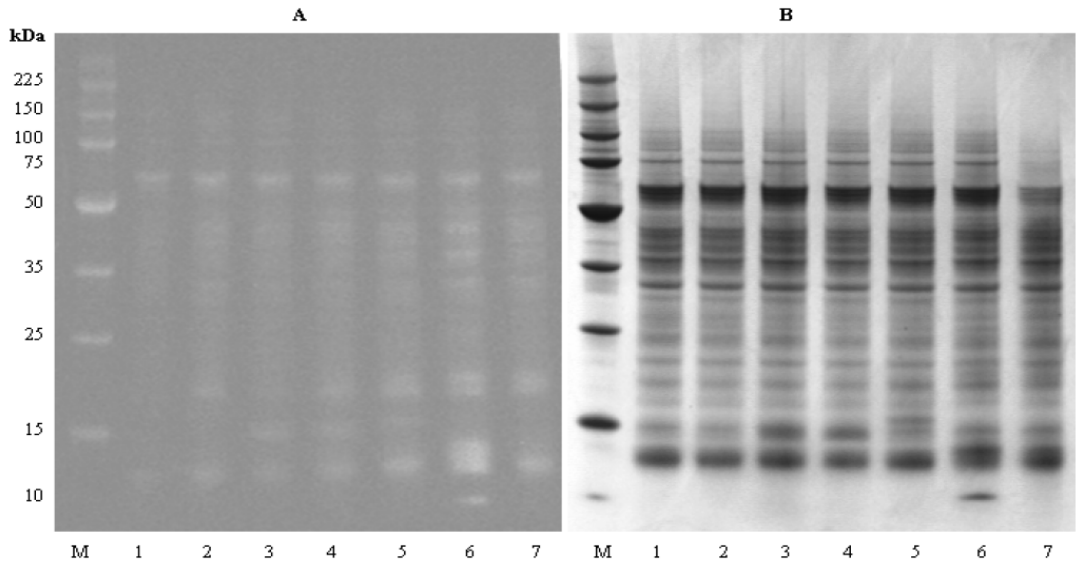


Fig. 2. SDS-PAGE analysis (10%) of Trx with F1 protein fraction. Following incubation with the indicated Trx, protein samples were derivatized with mBBr, and fluorescence was visualized electrophoresis (**A**). Gels were then stained with Coomassie R250 (**B**). M: molecular marker; lane 1: protein alone; lane 2: protein with DTT at a final concentration of 0.25 mM; lanes 3 to 7: interaction with 5 mM of Trx*h*2, Trx*h*1, Trx*h*3 and Trx*coli* respectively with DTT at a final concentration of 0.25 mM; lane 7: protein with 1 mM DTT.

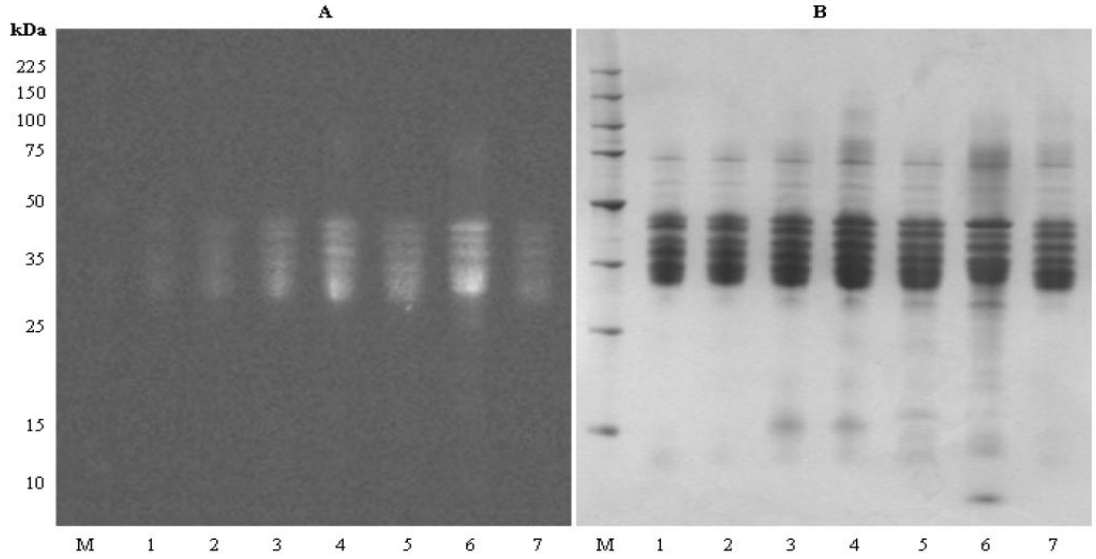


Fig. 3. SDS-PAGE analysis (10%) of Trx with F2 protein fraction. Following incubation with the indicated Trx, protein samples were derivatized with mBBr, and fluorescence was visualized electrophoresis (**A**). Gels were then stained with Coomassie R250 (**B**). M: molecular marker; lane 1: protein alone; lane 2: protein with DTT at a final concentration of 0.25 mM; lanes 3 to 7: interaction with 5 mM of Trx*h*2, Trx*h*1, Trx*h*3 and Trx*coli* respectively with DTT at a final concentration of 0.25 mM; lane 7: protein with 1 mM DTT.

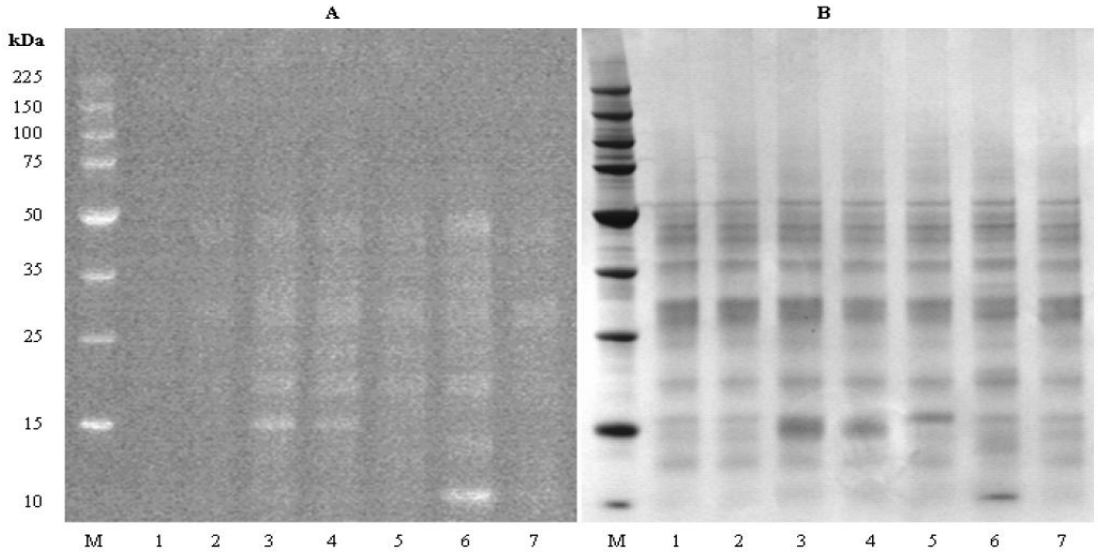


Fig. 4. SDS-PAGE analysis (10%) of Trx with F3 protein fraction. Following incubation with the indicated Trx, protein samples were derivatized with mBBr, and fluorescence was visualized electrophoresis (**A**). Gels were then stained with Coomassie R250 (**B**). M: molecular marker; lane 1: protein alone; lane 2: protein with DTT at a final concentration of 0.25 mM; lanes 3 to 7: interaction with 5 mM of Trx*h*2, Trx*h*1, Trx*h*3 and Trx*coli* respectively with DTT at a final concentration of 0.25 mM; lane 7: protein with 1 mM DTT.

Science Track

The alcoholic protein fraction (F2) presents a typical protein class ranging from 30 to 50 kDa corresponding to α, β, and γ gliadins (Fig. 3B) in which there are very few free cysteines in the native fraction. Trx*h* interaction induces almost two phenomena. The most imminent is the reduction of disulfides bonds as can be highlighted with fluorescence (Fig. 3A), as it was underlined in an earlier work of Kobrehel et al. (1992). Interaction of Trx*h* with the protein fractions induces different patterns (Fig. 3B). On the basis of these data, it seems that there is a relationship between a Trx*h* activity and its molecular mass. Indeed, the reductase activity increases as follow: Trx*h*3 < Trx*h*2 < Trx*h*1 < Trx*coli* (Fig. 2A). The evaluation of the redox potential of the different Trx*h* will be able to validate this assumption. In addition, the interaction of Trx*h*1 and Trx*coli* with protein fraction F2 induces at the same time a release of new proteins as we can observe in the whole lane and the formation of high molecular weight polymers above 50 kDa with a weak associated fluorescence (Fig. 3A and B, lines 4 and 6). The analysis of the protein profile by western blot with an anti-Trx*h*1 antibody shows that Trx*h*1 is associated with high molecular weight polymers (results not shown). This behaviour is observed with Trx*h*2 and to a lesser extent with Trx*h*3.

Protein fraction F3 contains the less soluble proteins and in particular glutenin polymers as we can observe it on the top of gel (Fig. 4B). It can be observed that Trx*h*1 and Trx*h*2 show the same reducing capacity with proteins of a molecular mass under 50 kDa. Trx*h*3 exhibits a lower efficiency whereas *E. coli* Trx exhibiting the high efficiency. It seems that Trx*h* shows an inverse correlation between molecular mass and reducing capacity (Fig. 4A).

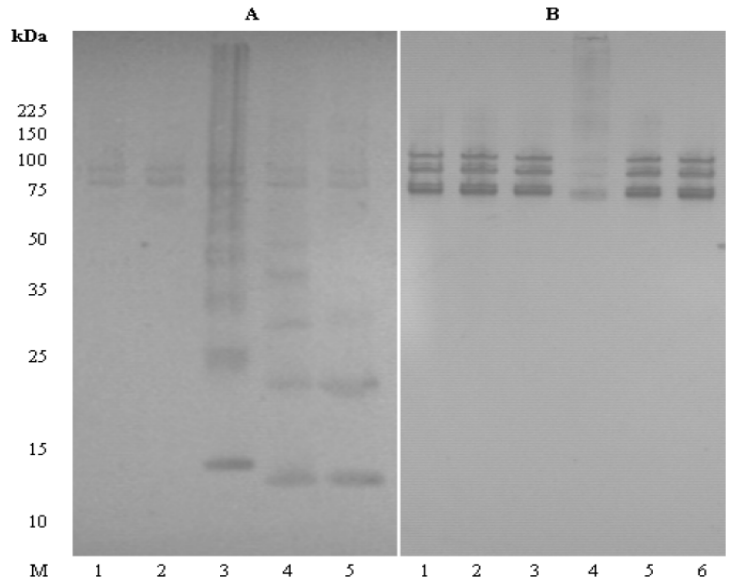


Fig. 5. Immunological characterization Trx*h* interaction with F4 protein fraction. Protein extracts (30 µg) were analyzed by SDS-PAGE (10%) and probed with anti-Trx*h*1 (**A**) or anti-HMWy10 (**B**). (**A**) lane 1: protein alone; lane 2: protein with DTT at a final concentration of 0.25 mM; lanes 3 to 5: interaction with 5 mM of Trx*h*1, Trx*h*1C11S, Trx*h*1C11S-C43S respectively with DTT at a final concentration of 0.25 mM. Trx*h*1 was cloned in pET16b expression vector (Invitrogen) and Trx*h*1 mutants were cloned in pQE30 expression vector (Qiagen). (**B**) lane 1: protein alone; lane 2: protein with DTT at a final concentration of 0.25 mM; lanes 3 to 6: interaction with 5 mM of Trx*h*2, Trx*h*1, Trx*h*3 and Trx*coli* respectively with DTT at a final concentration of 0.25 mM.

Trx*h*1 mutants were used in order to analyze the role of Cys11 in the interaction with targets proteins. The patterns of western blot show that Cys11 is involved in the formation of network with targets proteins. Indeed, when Trx*h*1 interacts with protein fraction F4, the reductase is detected by an anti-Trx*h*1 antibody on the whole lane, and specially associated with the high molecular weight polymers (Fig. 5A, lane 3), as it was previously observed with less intensity in protein fraction F2.

The interaction with the mutants Trx*h*1C11S (lane 4) and Trx*h*1C11S-C43S (lane 5) shows that the substitution of Cys11 is enough to abolish the association of Trx*h*1 with the high molecular weight polymers. Analysis of the interaction of different Trx with fraction F4 by western blot using an anti-HMWy10 antibody shows that the formation of high molecular weight polymers is primarily due to the presence of Trx*h*1 (Fig. 5B, line 4) which induces the formation of a protein network via Cys11.

Trx*h* is known for its reductase activity and indeed these experiments confirm their aptitude to reduce various protein fractions of wheat endosperm. Furthermore, we could discriminate these Trx on the basis of their reducing efficiency in particular with the protein fraction F2. These Trx are different by a certain number of amino acids which must influence their microstructures and consequently their specificity for the targets. But these proteins are characterized especially by the extension of the N-terminal domain which must have some importance in the protein reducing efficiency. These experiments also underlined the ambivalence of Trx*h*, and in particular that of Trx*h*1 class which could be involved in the formation of high molecular weight polymer by cross-linking glutenin subunits. These data open biotechnological perspectives for the modulation of polymers related to flour technological quality or gluten properties management during kneading.

LITERATURE CITED

Besse, I., Wong, J. H., Kobrehel, K., and Buchanan, B. B. 1996. Thiocalsin: A thioredoxin-linked substrate specific protease dependent on calcium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3169-3175.

Buchanan, B. B., and Balmer, Y. 2005. Redox regulation: A broadening horizon. Annu. Rev. Plant Biol. 56:187-220.

Buchanan, B. B., Schürmann, P., Decottignies, P., and Lozano, R. M. 1994. Thioredoxin: A multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medecine. Arch. Biochem. Biophys. 314:257-260.

Cazalis, R., Pulido, P., Aussenac, T., Pérez-Ruiz, J. M., and Cejudo, F. J. 2006. Cloning and characterization of three thioredoxin h isoforms from wheat showing differential expression in seeds. J. Exp. Bot. 57:2165-2172.

Cho, M.-J., Wong, J., Marx, C., Jiang, W., Lemaux, P. G., and Buchanan, B. B. 1999. Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in germinating barley seeds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:14641-14646.

Fu, B. X., and Sapirstein, H. D. 1996. Procedure for isolating monomeric proteins and polymeric glutenin of wheat flour. Cereal Chem. 73:143-152.

Guo, H.-X., Yin, J., Ren, J.-P., Wang, Z.-Y., and Chen, H.-L. 2007 Changes in proteins within germinating seeds of transgenic wheat with an antisense construct directed against the thioredoxin. J. Plant Physiol. Mol. Biol. 33:1-7.

Kobrehel, K., Wong, J. H., Balogh, A., Kiss, F., Yee, B. C., and Buchanan, B. B. 1992. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin *h*. Plant Physiol. 99:919-924.

Wong, J. H., Kim, Y.-B., Ren, P.-H., Cai, N., Cho, M. J., Hedden, P., Lemaux, P. G., and Buchanan, B. B. 2002. Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:16325-16330.

Conclusions et perspective

Les interactions des Trxs *h* avec les protéines de réserve et principalement les protéines des fractions F2 et F3 d'Osborne correspondant aux fractions gliadiques et gluténiques du blé respectivement, et les protéines de la fraction F2 du maïs représentée par le groupe des zeins contenant principalement des protéines de l'α-zein (Zahid et al, 2007 [livre du CSIC, Voir annexe 1]), induit la réduction des liaisons de ponts disulfures. Ces résultats ont déjà été montrés dans les travaux de Kobrehel et al., 1992 sur l'orge puis de nombreux autres travaux par la suite. Cependant, l'apport du présent travail consiste en la discrimination de différentes Trx *h*. Il confirme en effet l'impact de l'activité réductrice de ces protéines sur l'état rédox de protéines de réserve. Il montre également que certains de ces groupes thiols ont une fonction oxydative, d'où il en résulte la formation de polymères de hauts poids moléculaires. L'effet de la masse moléculaire de la protéine doit être pris en compte, car celle-ci peut jouer sur l'accessibilité de la protéine à des groupements thiols plus ou moins enfouis dans les polymères. L'utilisation de Trx d'*E. coli* comme contrôle semble en effet confirmer l'effet masse moléculaire. L'information obtenue d'*E. coli* demeure pourtant relative dans la mesure où cette Trx n'est pas physiologiquement présente dans le système du blé. Néanmoins, l'action de la Trx *h*1 semble corroborer l'effet masse.

Par rapport aux autres isoformes du modèle, la Trx *h*1 se distingue par ses propriétés réductices et oxydantes. La fonction oxydante est liée à la présence de la cystéine C11 dans le domaine N-terminal. Si la Trx *h*2 apparaît comme la Trx *h* standard, l'ambivalence de la Trx *h*1 fait qu'elle se présente comme la protéine type dont il serait souhaitable de moduler l'expression afin de vérifier son implication dans la qualité tant technologique que germinative du grain, ainsi que dans le contrôle du stress oxydatif dans la jeune plantule en condition de stress.

EFFET D'UN ELICITEUR SUR L'EXPRESSION DES MARQUEURS DU SYSTEME MODELE LORS DES PREMIERES PHASES DE LA GERMINATION DU BLE

A ZAHID, JA TRAVERSO, FJ CEJUDO AND R CAZALIS

(EN PREPARATION)

La graine constitue le principal vecteur de multiplication chez les végétaux et c'est un stade de développement critique qui présente de nombreuses spécificités. La graine possède une grande diversité de systèmes, impliqués dans différents processus tels que la protection, la détoxification ou encore la réparation, lui permettant de se conserver à l'état sec et déterminant sa capacité germinative. Malgré les efforts pour obtenir des variétés de plantes cultivées résistantes à de nombreuses maladies, les pertes dues aux agents pathogènes restent importantes. Différentes techniques ont été utilisées pour améliorer le rendement des plantes, comme l'utilisation des fongicides ou de la transgénèse. Ces méthodes restent contestées, la première pour ces effets sur l'environnement et la deuxième pour des questions de société. Dernièrement, les connaissances ont progressé de manière considérable sur la caractérisation des signaux produits et échangés lors des interactions entre plantes et agents pathogènes. Certains signaux semblent impliqués dans la stimulation de l'immunité des plantes pour faire face à la production de molécules toxiques. Parmi ces derniers, on peut citer ceux qui sont impliqués dans la biosynthèse de composés allant renforcer la paroi pecto-cellulosique ainsi qu'un ensemble de gènes codant pour des protéines très résistantes, comme les protéines PR (Pathogenesis Related), présentant des activités antimicrobiennes.

Des éliciteurs ont été caractérisé dans différents organismes, certains sont des fragments de glucanes et de chitines dérivés des parois de cellules fongiques et d'algues. D'autres des glycoprotéines ou des peptides et des protéines. Quelque soit leur nature, ces éliciteurs sont capables d'induire l'expression des moyens de défense des plantes. Ces molécules font parties de l'ensemble des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern).

Les plantes possèdent leurs propres systèmes de protection. Des études ont montré la présence de protéines impliquées contre le stress oxydatif dans le grain mature et pendant le stade de germination. La production des ROS pendant ces phases entraîne des dommages pour les protéines du grain (Baily, 2004; Job et al., 2005; Rajjou et al., 2007). Pour mieux faire face aux effets négatifs des ROS, les graines ont développé des mécanismes de détoxification, parmi lesquels les enzymes du système antioxydant (catalase, superoxyde dismutase, ascorbate peroxydase...). De récentes études ont indiqué la présence de ces enzymes dans le grain mature et pendant la germination (Oracz et al., 2007). Il est à noter également qu'un certain nombre de protéines chez *Arabidopsis* sont la cible des Trxs du blé (*Triticum aestivum*) (Wong et al., 2004) pendant les deux phases. Ce résultat supporte le lien

entre les ROS et les régulations redox catalysées par les Trxs dans le grain (Job et al., 2005). Le rôle d'une autre protéine durant ces deux phases a été mis en évidence, il s'agit des Prxs et particulièrement la 1-Cys-Prx. Faisant partie des LEA (late embroygenesis abundant), elle s'exprime pendant la phase de maturation du grain, phase sensible dans le développement du grain mais aussi pendant la germination, où cette protéine est impliquée dans la protection contre le stress oxydatif (Haslekas et al, 2003).

L'objectif de cette étude consiste à mettre en évidence l'effet d'un éliciteur comme la laminarine (β-glucan) sur la germination et dans le déclenchement des éléments de défenses naturelles du blé. La laminarine grâce à sa structure lineaire est connue pour ces propriétés élicitrices des moyens de défenses des plantes (Klarzynski et al., 2000; Minard et al., 2004). De plus, il a été montré que les parois de *Fusarium oxysporum*, champignon connu pour attaquer le blé pendant la maturation, présentent un rapport chitine/laminarine elévés (Sivan et Cheti, 1989).

Ainsi, nous avons suivi l'expression d'un certain nombre de marqueurs connus pour leurs rôles dans la protection contre les stress oxydatifs, parmi lesquels la 1-Cys-Prx, protéine spécifique du grain du blé, mais aussi des marqueurs comme la catalase du système antioxydant, et les PR.1.1 pour leurs activités antimicrobiennes. Le déclenchement de ces éléments de défense naturelle à l'aide d'éliciteurs exogènes (β-1,3 glucanases et les oligochitines), permet d'envisager de nouvelles stratégies de protection phytosanitaire plus respectueuse de l'environnement.

3 Matériels et méthodes

3.1 *Matériel biologique*

Des grains de blé (*Triticum aestivum*, cv Soissons) sont d'abord stérilisés en surface. Ils sont mis à germer sur du papier filtre humide dans des boîtes de Pétri dans des conditions stériles. Le stress biotique a été simulé par l'ajout d'une solution de laminarine d'une concentration finale de 200 µg/mL^{-1} (solution de β-1,3-pentaglucan ; Sigma Aldrich). Les boîtes sont placées dans une armoire phytotronique (*Fisher bioblock Scientific)*, sous le régime de 23°C pendant 16h et 16°C pendant 8h. Simultanément, une série d'échantillons témoins a été réalisée dans les mêmes conditions, en ajoutant de l'eau stérile à la place de la solution de la laminarine. Finalement des prélèvements sont réalisés à différents moments au cours de la germination (12h, 24h, 48h et 72h), sur lesquels les analyses seront réalisées. Dans tous les cas, les échantillons sont congelés dans l'azote liquide puis conservés à -20°C jusqu'au prochain usage.

3.2 *Extraction d'ARN et analyses par QRT-PCR*

L'extraction de l'ARN total a été réalisée sur l'ensemble des échantillons selon le protocole du kit «RNeasy Plant Mini Kit». A partir de chaque échantillon, 0,5 µg d'ARN sont utilisés pour la réverse transcription en ADNc à l'aide d'amorces hexamèrique en présence de Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems). Les conditions du PCR sont 1 cycle à 25°C pendant 10 minutes, 1 cycle à 37°C pendant 2 heures, 1 cycle à 85°C pendant 5 secondes et 1cycle à 4°C pendant une minute. Les expressions des gènes de la Trx *h*1, 1-Cys-Prx, P.R1.1 et la Catalase ont été suivies par QRT-PCR. Des aliquotes (1µl) d'ADNc sont soumises à la QPCR en temps réel dans un thermocycleur ABI PRISM 7700. L'amplification est réalisée en utilisant les réactifs du kit QuantiTec SYBR Green (Qiagen) dans un volume final de 25 µl. Les conditions du PCR sont 1 cycle de 2 minutes à 50°C ; 1 cycle à 95°C pendant 15 minutes; puis 40 cycles à 94°C pendant 15 secondes, 63°C pendant 30 secondes et à 72°C pendant 20 secondes. Pour chaque marqueur, les amorces sont dessinées par le programme Primer Express (Applied Biosystems). La quantification relative d'un gène donné est exprimée, après normalisation par l'expression de l'ARNr 18S, utilisé comme

contrôle interne, en pourcentage de l'expression d'une référence par la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001). Le Tableau 2, regroupe les primers des gènes quantifiés.

Amorces	Séquences 5'>3'	
ARN 18S	AGTAAGCGCGAGTCATCAGCT,	CATTCAATCGGTAGGAGCGAC
1-Cys-Prx	CGACCAGCTAGCTTTGATTG,	AAGCGCGGAGCTAGC
PR.1.1	ACTACGACTACGGGTCCAACA,	TCGTAGTTGCAGGTGATGAAG
Glu-3	CCTTGCCTCTTTGTATGCTGA,	TCATCTTTTGTGGGTTCTTGC
LTP-1	ACGTAGGTACTCCTCGCTGT,	GTTGATCGACCACTTCTTCTCA

Tableau 2 : Liste des amorces des gènes analysés en qRT-PCR.

Pour le suivi de l'accumulation des transcrits de la 1-Cys-Prx pendant la maturation du grain, des prélèvements ont été réalisé à différents moments après la floraison, et analysés par QRT-PCR, selon le même protocole décrit ci-dessus.

3.3 *Analyse par Western blot*

Les protéines ont été extraites dans un tampon contenant 50 mM Tris-Hcl (pH 8), 1mM d'EDTA (éthylenediaminetetraacetic acid) et 0,5 mM de PMSF (phénylméthanesulphonylfluoride) (Sigma). Après la détermination des concentrations des protéines par le dosage de Bradford, les échantillons protéiques sont dilués dans du tampon de charge contenant du β-mercaptoéthanol. Les protéines sont dénaturées par chauffage à 100°C durant 5 min, et séparées par électrophorèse. Une masse de 30 µg de protéines est déposée sur un gel de polyacrylamide Nu-PAGES (4-12 %). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (*PVDF,* Polyvinylidene Difluoride membrane, Sigma-Aldrich). L'immuno-détection des protéines de la Trx *h*1 et de la 1-Cys-prx est réalisée par des anticorps anti-Trx h 1 et anti-Per1 couplés respectivement avec les anticorps Anti-Chicken Ig Y et Anti-Rabbit Ig G (Sigma). Finalement, après révélation grâce au substrat Sigma FAST^{TM} (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro Blue Tetrazolium Tablets ; Sigma), les bandes sont quantifiées par le logiciel QuantiScan.

De la même façon, des protéines extraites de différents tissus de grains en stade de germination et de feuilles ont été analysés par western blot, pour suivre l'expression de la 1-Cys-Prx. Ces extraits protéiques ont été réalisés à partir de graines germées dans des conditions témoins.

3.4 *Dosage des activités enzymatiques*

Catalase

Le matériel végétal a été broyé dans de l'azote liquide, 500 mg a été repris avec 1 mL du tampon KH_2P0_4 0,2 M (pH 7,3), contenant 1 mM d'EDAT, 1 mM d'ascorabate et 2 mM de β-mercapto-éhanol. La solution a été centrifugée à 14000 g pendant 15 min. L'activité de la catalase a été suivie par la diminution de la vitesse de dégradation du H_20_2 à 240 nm (ε=39,4 $M^{-1}cm^{-1}$) (Beaumont et al., 1990).

Ascorbate peroxydase (APX)

Pour l'extraction des enzymes de l'APX, 500 mg du matériel végétal broyé dans l'azote liquide, a été mélangé avec 1,5 mL du tampon $KP0_4$ 100 mM (pH 7), contenant 2 mM du pénylméthylsulphonyl fluoride (PMSF). L'ensemble est centrifugé à 14000g pendant 20 min, et l'activité de l'APX a été mesurée par l'oxydation de l'ascorbate à 280 nm (ε=7,83 mM-1cm-1) (Smirnoff et Colombé, 1988).

4 Résultats

4.1 *Etudes de la Peroxyredoxine-1 (1-Cys-Prx)*

L'alignement de la 1-Cys-Prx du blé avec de multiples isoformes de différentes sources (Figure 23), montre la présence de trois résidus de cystéines conservés chez les céréales (Cys 46, Cys 72 et Cys 147) (Choi et al., 1998).

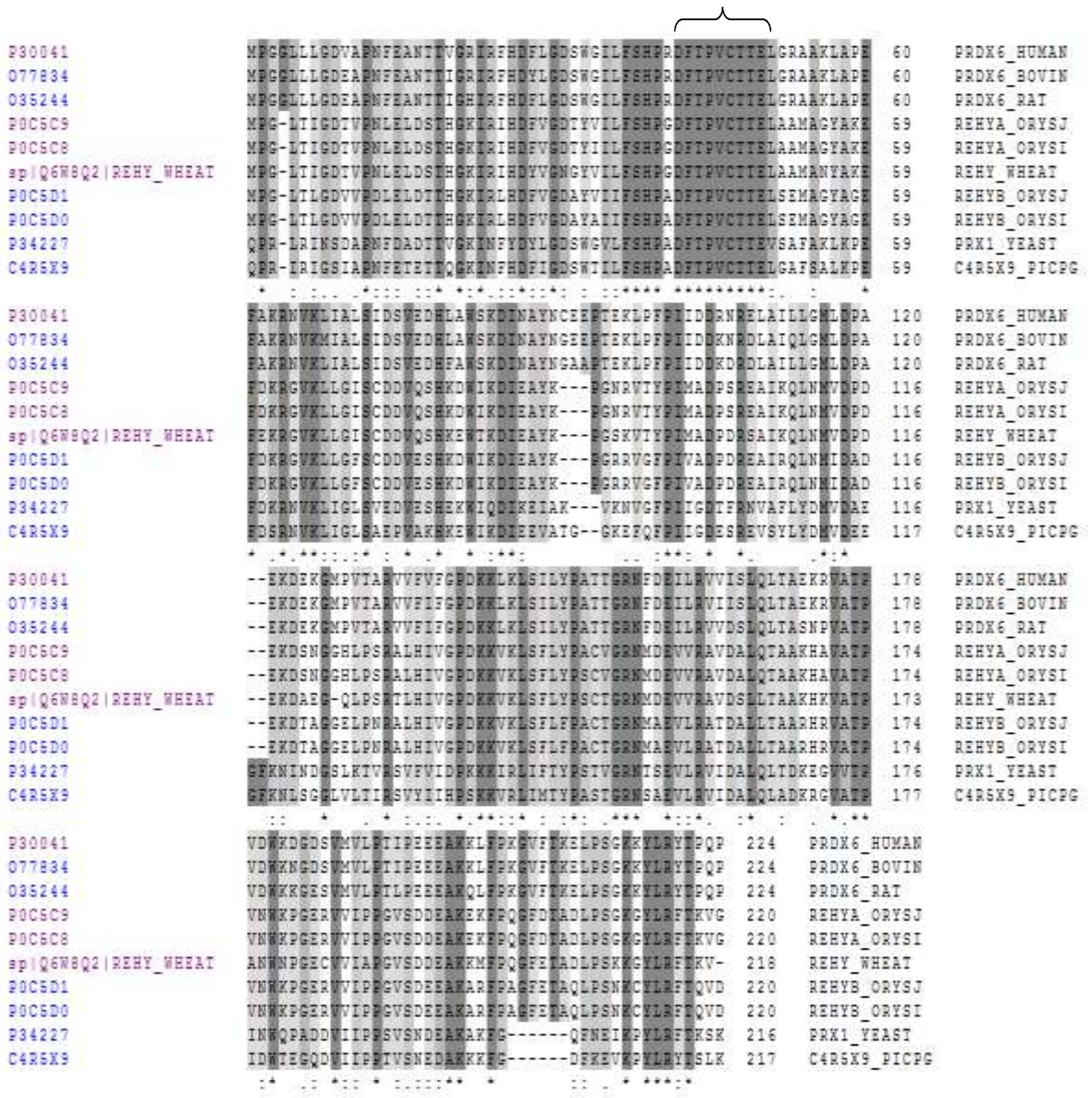


Figure 23 : Alignement multiples de 1-Cys-Prx de différentes espèces. La séquence de la protéine de blé TaPer1 a été alignée avec la 1-Cys-Prx de différentes sources disponibles dans des bases de données, en utilisant le programme ClustalW2. Les nombres d'accessions sont**:** *Homo sapiens* (Human) ; P30041; *Bos taurus* (Bovine), O77834; *Rattus norvegicus* (Rat),O35244; *Oryza sativa* subsp. Japonica (Rice),P0C5C9; *Oryza sativa* subsp. indica (Rice), P0C5C8; Triticum aestivum (Wheat),Q6W8Q2; *Oryza sativa subsp. japonica* (Rice), P0C5D1; *Oryza sativa subsp. indica* (Rice), P0C5D0; *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast),P34227; *Pichia pastoris* (Strain GS115) (Yeast), C4R5X9.

L'étude des interactions entre la 1-Cys-Prx et le système NTR/Trxh, responsable de l'activation de cette protéine, montre l'implication de la Cys 46 dans la catalyse de ces réactions, confirmant l'activité peroxydatique de ce résidu (Pulido et al., 2009). Cette cystéine

est très conservée pour toutes les plantes, par rapport à la cystéine 147, qu'est conservée chez les céréales, mais absente chez *Arabidopsis thaliana*.

La Figure 24 montre la protéine recombinante de la 1-Cys-Prx, avec une masse moléculaire d'environ 28 kDa. Cette protéine se trouve généralement sous forme dimérique.

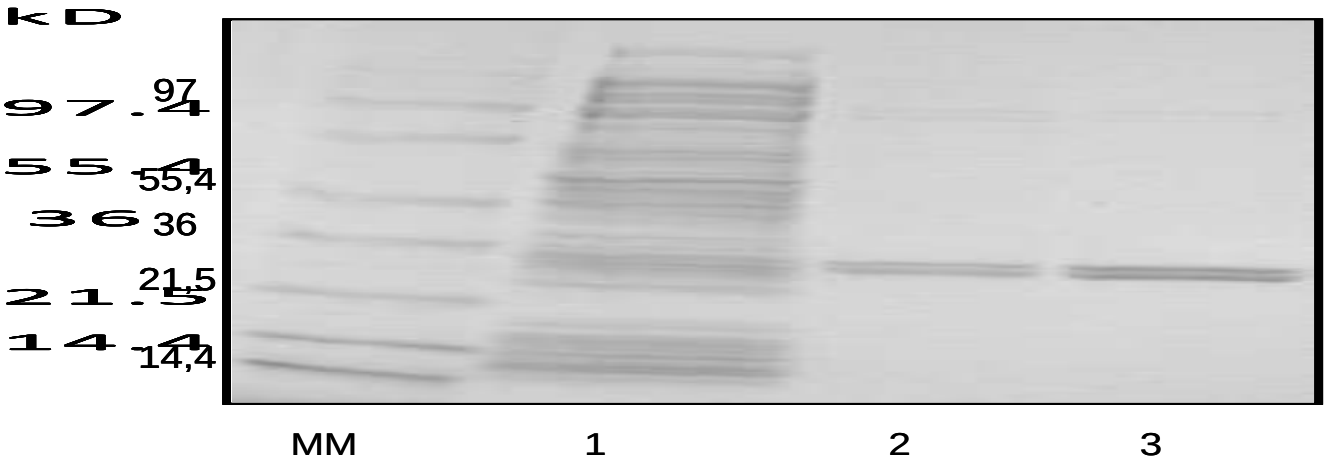


Figure 24 : Après expression de la 1-Cys-Prx, les protéines recombinantes ont été purifiées sur des colonnes Ni-NTA (Qiagen), ensuite elles ont été appliquées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. MM: Marqueur moléculaire, 1: Extrait brut des bactéries BL21, 2 et 3: Protéine recombinante.

Une analyse par mutation séquentielle des résidus de cystéines montre l'implication de ces résidus dans la dimérisation de la protéine (Figure 25), résultat qui a été confirmé dans les travaux de Pulido et al., 2009. Seule une incubation dans du DTT (dithiothrietol) à une concentration de 20 mM et pendant 20 min peut aboutir à la forme monomérique (Figure 25, ligne WT/DTT).

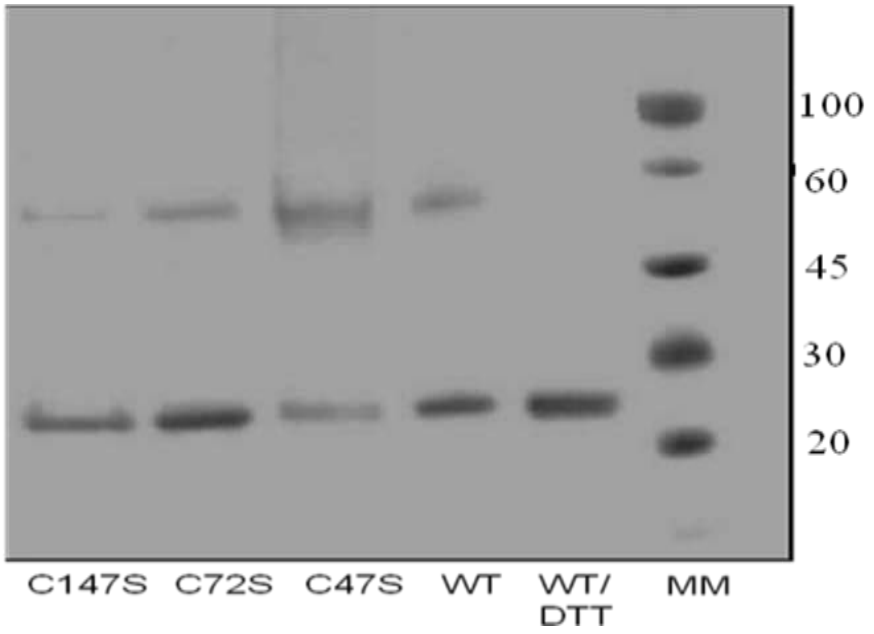


Figure 25 : Purification des protéines recombinantes sauvages et des mutantes de la 1-Cys-Prx-Tag His par chromatographie sur des colonnes Ni-NTA. Les protéines purifiées ont été appliquées sur un gel SDS-Page en conditions réductrices.

L'analyse de l'expression et de l'accumulation des transcrits et des protéines de la 1-Cys-Prx pendant la maturation du grain de blé (cv Soissons) par QRT-PCR et par western blot, montre effectivement une accumulation pendant la maturation du grain pour atteindre son maximum à la fin de cette phase (35 JAA) (Figure 26A, B).

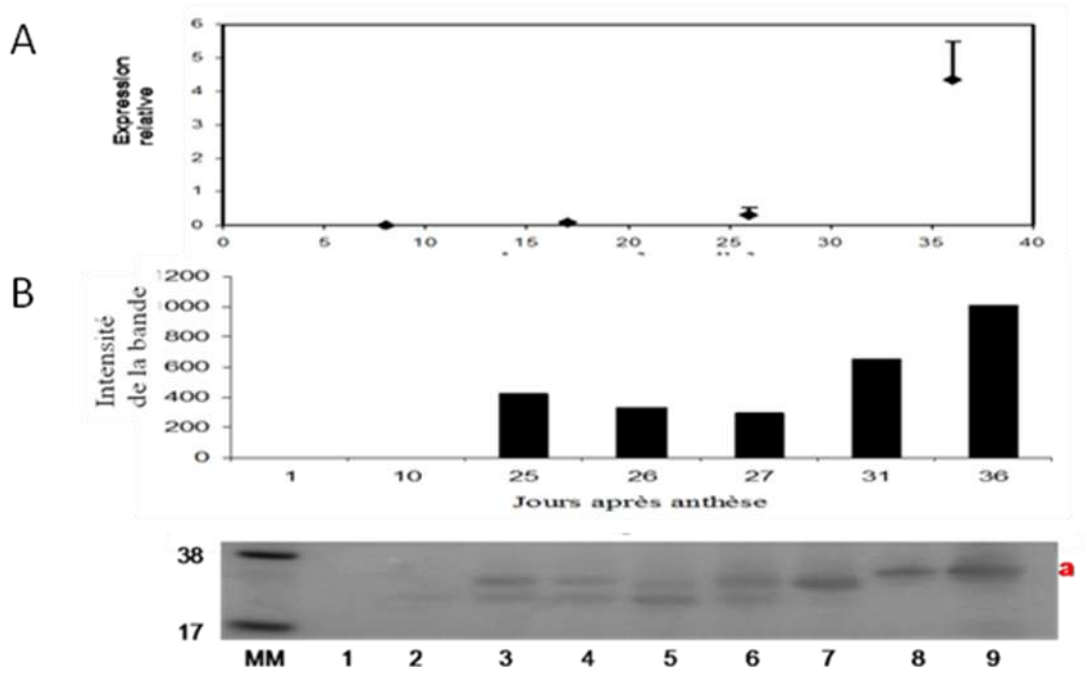


Figure 26 : Suivi de l'expression des transcrits et des protéines de la 1-Cys-Prx pendant la maturation (après l'anthèse), respectivement par qRT-PCR (A) et par Western blot (C). La bande du haut (a) correspondant aux protéines de la 1-Cys-Prx obtenue par western blot a été quantifiée par le logiciel QuantiScan (B). Les prélèvements ont été réalisés à différents jours après floraison (JAF), 1: 0J, 2: 10J, 3: 20J, 4: 25J, 5: 30J, 6: 35J, 7: 37J, 8 et 9: Protéines recombinantes, MM: Marqueur moléculaire.

Cependant, les expressions des transcrits et des protéines de la 1-Cys-Prx pendant la germination, présentent un profil contraire à celui obtenu pendant la maturation du grain. On assiste à une diminution des expressions au cours des premières phases de germination (

Figure **27**).

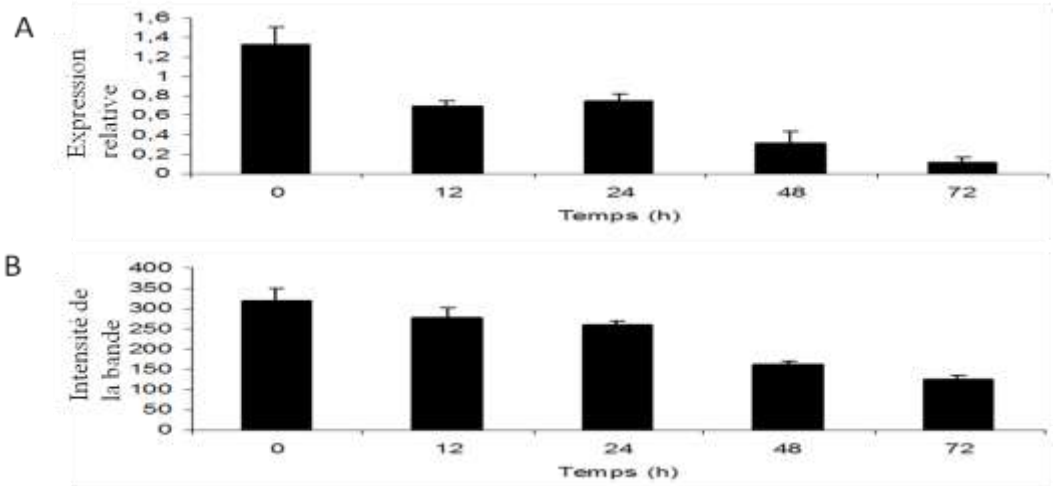


Figure 27 : Suivie de l'expression des transcrits et des protéines de la 1-Cys-Prx par qRT-PCR (A) et par westren blot (B). La bande correspondant aux protéines de la 1-Cys-Prx obtenue par western blot a été quantifiée par le logiciel QuantiScan (B). Les prélévements ont été effectués à 0, 12, 24, 48 et 72 h après imbibition du grain.

En même temps, le suivi de l'expression des protéines par western blot pendant la germination montre l'expression de la 1-Cys-Prx dans différents tissus du grain (Figure 28). Par contre cette protéine est absente dans des feuilles âgées (Figure 28, ligne 4). Ceci confirme d'avantage que cette protéine est exprimée majoritairement dans le grain (Stacy et al., 1999).



Figure 28 : Analyse de l'expression des protéines de la 1-Cys-Prx par western blot dans différents tissus du grain et des feuilles âgées de blé. 1: Apex racinaire, 2: Embryon, 3: Endosperme, 4: Feuille mature, 5: Couche aleurone.

5 Expression des marqueurs

5.1 *Taux de germination*

La mesure du taux de germination montre un développement rapide des grains stressés par rapport aux grains témoins (Figure 29). Le développement rapide des grains de blé peut s'expliquer par le fait que la laminarine joue le rôle d'un éliciteur, en induisant un mécanisme au niveau moléculaire qui accélère les processus métaboliques.

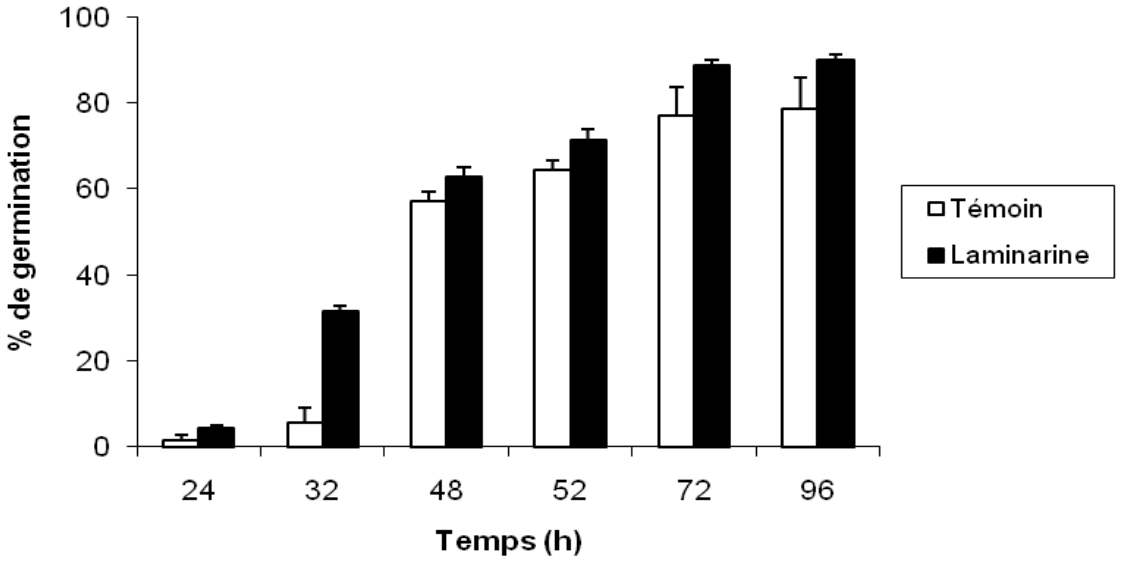


Figure 29 : Suivi du pourcentage de germination des grains de blé, mises à germer dans des conditions témoins et de stress provoquées par la laminarine (200µg.mL-1).

5.2 *Suivi de l'expression de la 1-Cys-Prx*

Cette étude montre l'effet du stress biotique simulé par la laminarine sur l'expression des marqueurs (Figure 30).

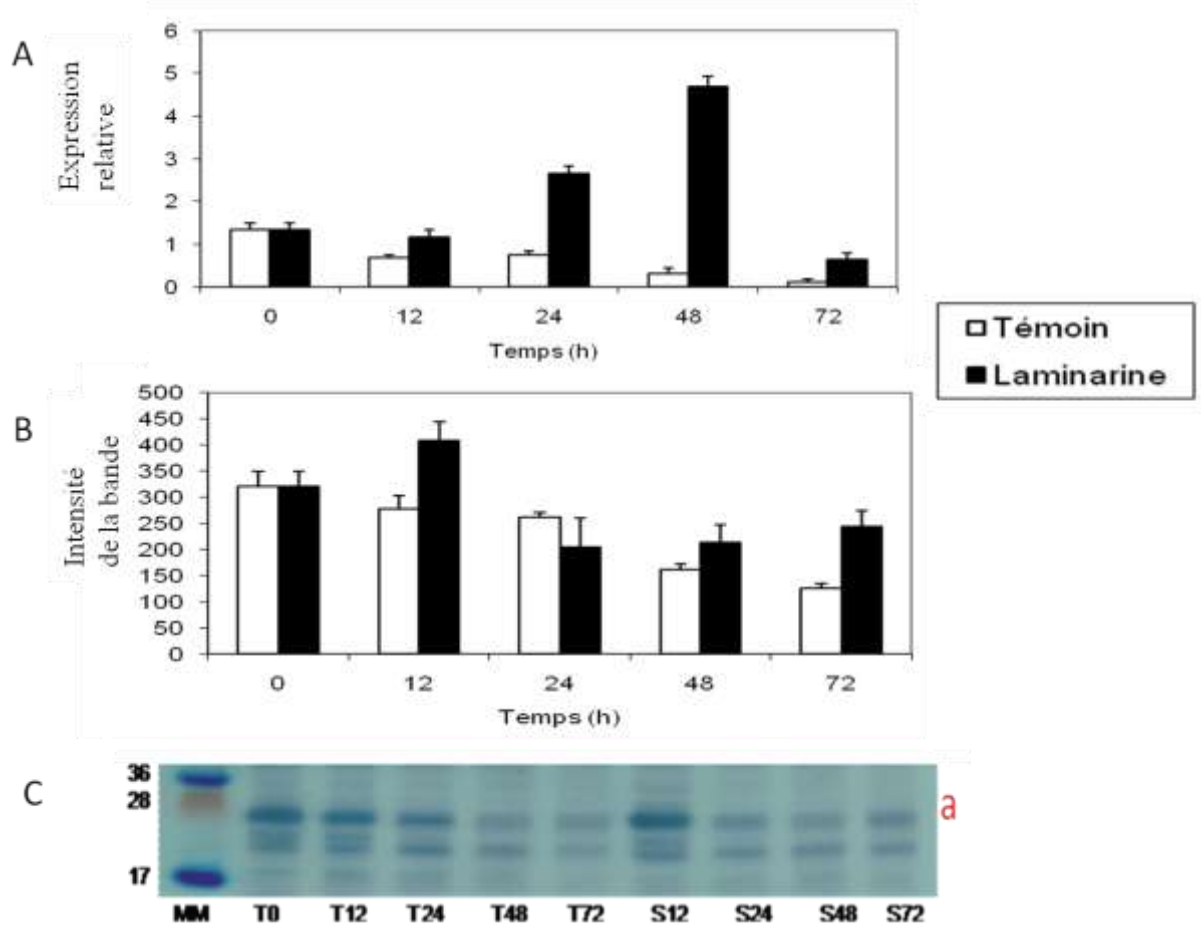


Figure 30 : Suivi de l'expression des transcrit et des protéines de la 1-Cys-Prx respectivement par qRT-PCR (A) et par western blot (C) pendant les premières phases de germination (0h, 12h, 24h, 48h et 72h). La 1-Cys-Prx correspond à la bande (a) située à environ 28kDa (A). Après analyse western blot, la bande de la 1-Cys-Prx (a) a été quantifiée par le logiciel QuantiScan (B). MM: Marqueur moléculaire, T: Echantillons témoins, S: Echantillons stressés.

La 1-Cys-Prx s'exprime dès le début de la germination (Figure 30B). Cette expression protéique est encore plus élevée en présence de la laminarine et cela dès 12 heures, avant que cette expression protéique ne diminue avec le temps. Si l'on compare l'expression de la peroxyrédoxine en conditions de stress avec les conditions témoins, on constate que l'activité de la 1-Cys-Prx est plus importante lors du stress. Par ailleurs, on observe dans les deux cas que l'expression diminue au cours de la germination. Mais elle reste tout de même plus importante dans les conditions du stress. L'analyse par qRT-PCR, de la 1-Cys-Prx montre une expression croissante dès le début de la germination pour atteindre un maximum à 48 heures

(Figure 30A), avant de diminuer considérablement. Cependant, chez le témoin, cette expression connait une diminution avec la germination.

5.3 *Suivi de l'expression des Trxs h*

L'analyse de l'expression des protéines des Trx *h* grâce à l'anticorps anti-Trx *h*1, révèle l'expression de trois isoformes de Trx *h* (Figure 31).

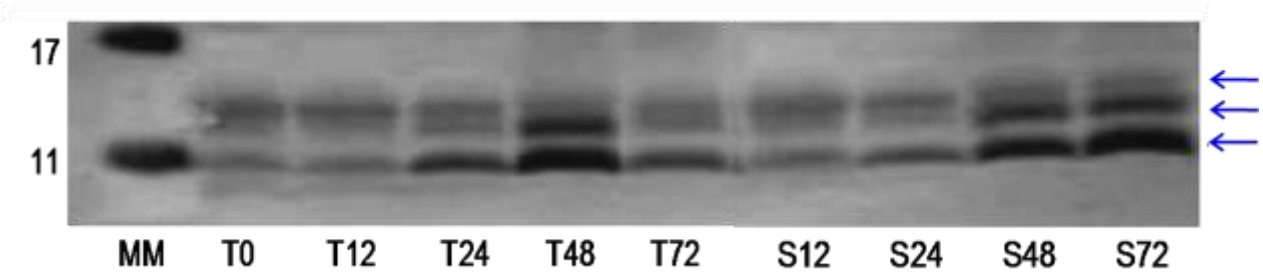


Figure 31 : Suivi de l'expression des protéines des Trxs *h* totales par western blot, en utilisant des anticorps anti-Trx *h*1 pendant les premières phases de germination (0h, 12h, 24h, 48h et 72h). Trois isoformes de Trx *h* ont été détectées notées par les lettres a, b et c (A). Quantification des trois bandes de Trxs *h* par le logiciel QuantiScan (B). MM: Marqueur moléculaire, T: Echantillons témoins, S: Echantillons stressés.

L'analyse par western blot révèle la présence de trois bandes correspondant aux Trxs *h*. L'expression est identique depuis le début de la germination jusqu'à 48 heures entre les échantillons témoins et stressés. Après 48 heures cette expression diminue chez le témoin, et reste importante dans les conditions de stress. Ce résultat montre dans un premier temps l'effet du stress simulé par la laminarine sur l'expression de ce marqueur, et ce malgré l'implication de ces protéines dans d'autres processus pendant ces phases.

5.4 *Expression de marqueurs de stress biotique*

L'analyse de l'expression des gènes des marqueurs liés au stress biotique par qRT-PCR, montre une expression croissante du gène PR.1.1 en présence de la laminarine, alors que cette expression reste stable chez le témoin. (Figure 32A). Cependant, la présence de la laminarine n'a pas induit l'expression des marqueurs LTP-1 (Lipid Transer Protein) et Glu – 3, après imbibition, mais une légère expression après trois jours de germination (Figure 32B et C).

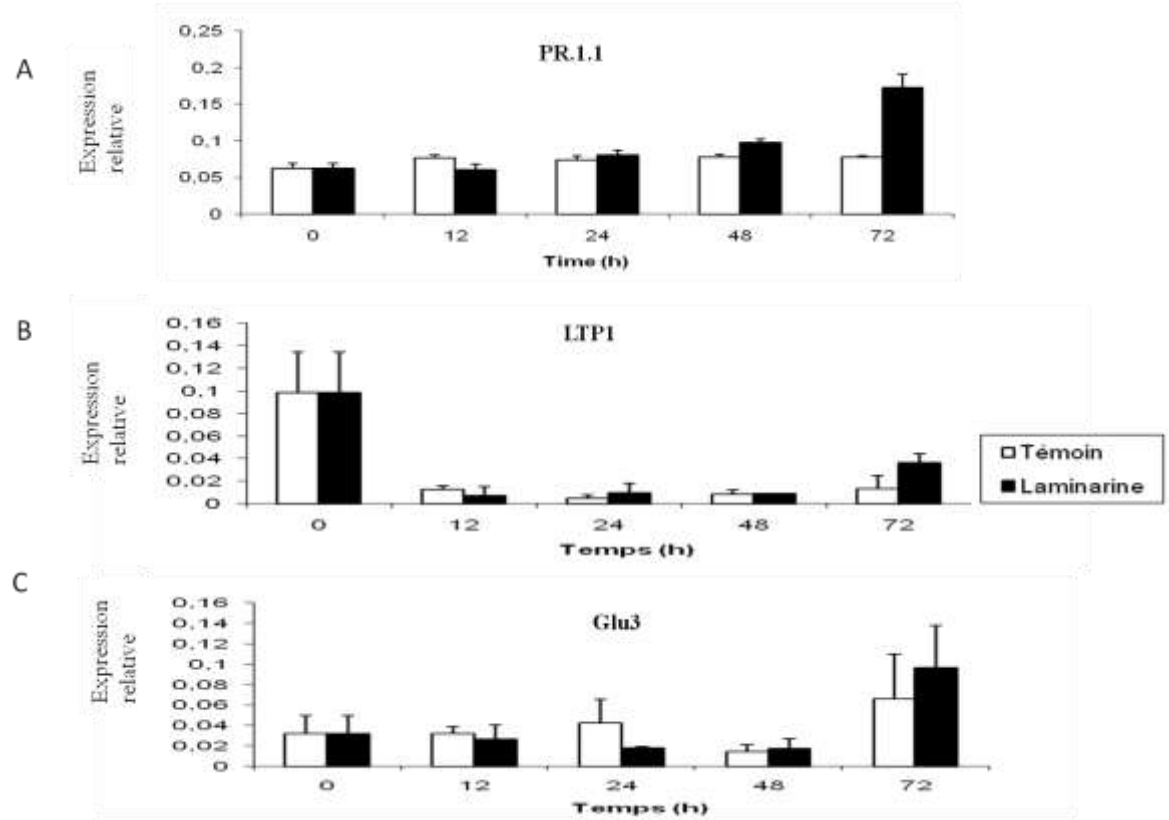


Figure 32 : Suivi de l'expression des transcrits par qRT-PCR des marqueurs impliqués dans le stress biotique simulé par la laminarine: Pr.1.1 (A), LTP1 (B) et Glu3 (C).

5.5 *Activités enzymatiques de la Catalase et l'Ascorbate peroxydase*

La catalase et l'ascobate peroxydase sont des enzymes du système antioxydant. Elles sont impliquées dans la protection contre le stress oxydatif par la détoxification des H_2O_2. Les résultats obtenus montrent que l'expression des transcrits de la catalase augmente en présence de la laminarine pour atteindre un maximum à 48 heures avant de diminuer (Figure 33B). Cependant, l'activité enzymatique ne montre pas de différences majeures entre les échantillons témoins et stressés jusqu'à 48 heures, après lesquelles l'activité augmente sensiblement pour atteindre un maximum à 72 heures en présence de la laminarine (Figure 33C). La comparaison des activités de ces deux enzymes montre une stimulation plus importante de la CAT par rapport à l'APX.

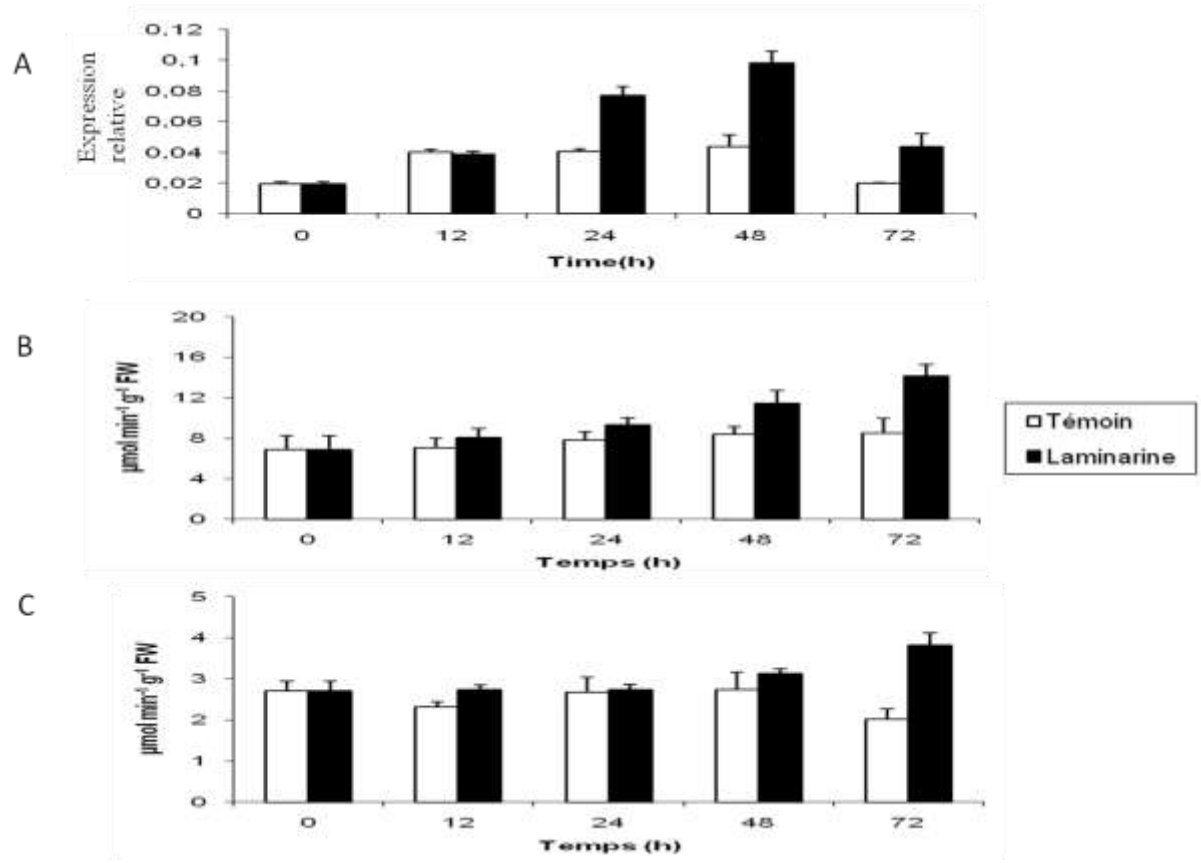


Figure 33 : Suivi de l'expression des transcrits de la catalase (A) par qRT-PCR, et les activités enzymatiques de la catalase (B) et de l'ascorbate peroxydase (C).

6 Discussion

Dans cette étude, la première chose qui retient l'attention concerne l'effet de la laminarine sur le taux de germination. En effet, on observe une accélération de la germination en présence de la laminarine. Cet effet peut s'expliquer par le fait que ces molécules (β-Glucan) agissent au niveau du métabolisme de développement. Elles sont impliquées dans divers processus de développement dont les divisions cellulaires. Un brevet français (No. 9208387) confirme les propriétés élicitrices de la laminarine et son utilité pour augmenter les réactions de défense des plantes. Il révèle en outre que la laminarine présente des propriétés élicitrices de l'α-amylase à l'origine de l'activation de la germination des graines et de la croissance des plantes.

L'application d'un stress pendant les premières phases de germination des graines de blé ou d'orge, montre que la vitesse de développement suit une courbe en cloche (Figure 34). A de faibles concentrations, des sustances comme l'H_2O_2, l'ozone, le NaCl ont effet postif sur la germination, cependant avec des concentrations élevées, les concentrations en H_20_2 sont fortes, cela réduit les pourcentages de germination.

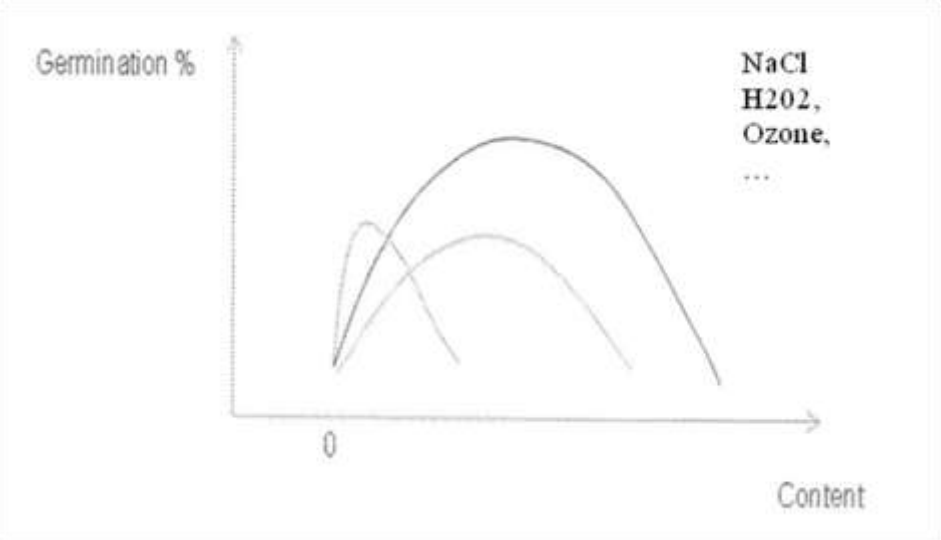


Figure 34 : Effet de la concentration de molécules ou de subsatnces sur les pourcentages de germination. A de faibles concentrations, ces substances on un effet positif sur la germination, cependant des concnetrations élevées ont un effet inverse.

Différentes études et principalement des brevets ont montré que la laminarine à une activité favorable sur les processus de germination (brevet N° WO/94/00993). D'autres études décrivent des propriétés élicitrices de la laminarine, suggérant son utilisation pour augmenter les réactions de défense des plantes. Ainsi, Netzer et al., 1979 révèlent qu'une infection par le pathogènes S. oxyporum déclenche l'induction de laminarinase. De même, Bonhoff et al., 1988, révèlent les propriétés de la laminarine en tant qu'éliciteur de phytoalexine et de callose.

L'étude entreprise dans ce travail a également permis de discriminer l'implication de chaque marqueur lors de l'application du stress biotique simulé par la laminarine. La deuxième donnée qui retient l'attention concerne l'induction des moyens de défenses du blé.

Cela est caractérisé par l'expression élevée des transcrits et des protéines de la 1-Cys-Prx dès le début de la germination par rapport aux conditions témoins. Il est connu que la 1-Cys-Prx est une protéine spécifique du grain et fait partie des protéines LEA (late embroygenesis abundant). Dans les plantes supérieures, les protéines LEA s'accumulent pendant les phases de maturation du grain. Elles s'expriment pendant des conditions de stress et à différentes étapes de développement du grain. Une distribution aussi large de ce type de protéines, confère une fonction de protection (Schneider et al. 1993; Wolkers et al. 1998; Bartels et Salamini 2001). Ces données suggèrent que les 1-Cys-Prxs accumulées pendant la maturation s'expriment à nouveau après imbibition du grain pour la protection contre le stress qui peut être produit avec la reprise des processus métaboliques. Ce résultat a été confirmé dans notre étude, en suivant les expressions des transcrits et des protéines pendant les phases de maturation et de germination du grain du blé.

L'induction de l'expression des protéines de la 1-Cys-Prx en présence de la laminarine, peut être expliquée par le rôle de défense de la 1-Cys-Prx contre le stress oxydatif comme démontré dans les travaux de Stacy et al., 1996. Ce résultat témoigne de l'importance des molécules comme la laminarine à stimuler les défenses des plantes et à les protéger contre les infections. Les β-1,3glucanes marins sont considérés comme des éliciteurs puissants de la plupart des réponses de défenses avec l'avantage de ne pas provoquer de mort cellulaire (Klarzynski et al., 2000). En même temps, ils protègent efficacement les plantes, y compris des plantes de grande culture (blé, orge, maïs), contre l'infection par des champignons causant d'importants préjudices à ces cultures (Joubert et al. 1998).

Les travaux d'Haslekas et al., 2003, ont pu montrer l'effet de stress provoqué par des solutions de NaCl et de mannitol sur les fréquences de germination, et de déterminer le rôle de la 1-Cys-Prx dans ces conditions. Cette étude a montré l'effet de la 1-Cys-Prx dans la protection contre le stress par l'inhibition de la germination. Ainsi, des plantes *d'Arabidopsis thaliana*, surexprimant le gène de l'AtPer1, sont caractérisées par une faible fréquence de germination, par rapport aux plantes témoins en présence de fortes concentrations de NaCl et de manitol. Cependant, avec de faibles concentrations de NaCl, les fréquences de germination sont identiques entre les graines des plantes transformées et les plantes témoins. Ces résultats montrent les effets contradictoires sur la germination selon l'origine des substances utilisées,

et le type de stress induit. Les éliciteurs exogènes comme la laminarine semblent agir à de faibles doses dans la mobilisation des métabolismes de défenses de la plante.

La fonction antioxydante de la 1-Cys-Prx, est accomplie par l'activation de cette dernière par le système NTR/Trx h (Wong et al., 2003; Pulido et al., 2009). Ainsi, il était indispensable d'étudier l'expression des Trx h durant les premières phases de germination. Il a été montré l'effet des conditions de stress sur l'expression des Trx h, par une forte accumulation de ces dernières dans les tissus et le noyau de cellules souffrants de stress oxydatif (Serrato et Cejudo, 2003; Serrato et al., 2001). Les conditions environnementales ont un faible effet sur l'expression des Trxs *h* pendant les premières phases de germination, à l'exception de la couche aleurone (Cazalis et al., 2006).

Dans cette étude, l'expression des Trx *h* pendant les premières phases de germination, ne peut pas être seulement expliquée par leur implication contre le stress, car les Trx *h* sont des protéines importantes pour la germination. Elles interviennent dans la mobilisation des protéines de réserve nécessaires au développement de nouveaux tissus, et à la croissance de l'embryon (Kobrehel et al., 1992; Lozano et al., 1996). Les Trxs augmentent leur sensibilité à la protéolyse en réduisant des enzymes impliquées dans la mobilisation de ces protéines, ou des inhibiteurs des enzymes amylolytiques comme l'α-amylase et la pullulanase, et l'activation de la thiocalsine (Kobrehel et al., 1991; Besse et al., 1996). Ces mécanismes facilitent la mobilisation de l'azote et de carbone dans l'endosperme permettant à l'embryon de se développer (Marx et al., 2003; Montrichard et al., 2003).

Parmi les autres moyens de défenses des plantes, les PRs (Pathogenesis Related) présentent de fortes activités antimicrobiennes. La laminarine fait partie des éliciteurs capables d'induire l'expression des PRs, et le PR.1.1 constitue le gène le plus abondant des familles des PRs. Notre étude confirme ce rôle de défense, puisque les gènes de PR.1.1 connaissent une augmentation croissante pendant les premières phases de germination.

Différentes molécules peuvent induire l'expression des PRs, comme certaines phytohormones (l'éthylène, l'acide jasmonique, l'acide salicylique) (Edreva, 1990, 1991; Tamás et al., 1997; Pääkkönen et al., 1998; Van Loon, 1999; Buchel and Linthorst, 1999; Fujibe et al., 2000). Il a été montré dernièrement, que l'acide salicylique augmente sensiblement l'expression des PR.1.1 chez *Arabidopsis thaliana*. Cependant des molécules comme le Paraquat ou l'UV-C n'ont pas d'effet sur l'expression des gènes des PR.1.1 chez

Arabidospsis thaliana, sauf chez certains mutants difficitairesen ascorbate (Colville et Smirnoff, 2008). Le rôle de l'acide salicylique dans la stimulation des moyens de défense est bien documenté. Mais en application externe, l'acide salicylique provoque des symptômes de stress sur les plantes. Ainsi, un analogue structural de l'acide salicylique a été mis sur le marché. Son utilisation est moins toxique. Les mécanismes d'action des PR.1.1 dans la protection contre le stress ne sont pas complètement établis, mais comme la plupart des PRs, ils ont un effet antifongique et antibactérien. D'une manière générale, les PRs forment une barrière protectrice contre le pathogène, en s'accumulant au niveau des sites d'infections et agissent pour diminuer la sensibilité de la plante.

Contrairement à ce qui est obtenu dans notre étude avec les marqueurs LTP-1 et Glu-3, dans les travaux de Lu et al., 2005, les expressions des marqueurs LTP-1 et LTP-2 et de Glu-3 sont beaucoup plus importantes. Ce résultat peut être expliqué par la sensibilité de ces marqueurs à la laminarine, ou aux faibles concentrations utilisées dans les conditions de l'expérimentation. La virulence du pathogène *Tilletia tritici* peut expliquer la forte expression des LTP-1 et 2 et de Glu3. Un point commun entre notre étude et les résultats fournis par Lu et al., 2005, concerne la forte sensibilité des PRs par rapport aux autres marqueurs, ce qui fait des PRs des marqueurs intéressants pour suivre la présence d'un stress provoqué par des pathogènes, voir d'origine animal.

Chez les céréales, la catalase est considérée comme un marqueur central dans la protection contre le stress oxydatif, principalement dans des conditions de stress abiotique. Ainsi, les travaux de Kim et al., 2005 et Khosravinejad et al., 2008, ont montré que l'activité de la catalase augmente dans les racines de l'orge pendant un stress salin. De même, des plantes infectées avec des virus connaissent une augmentation de l'activité des enzymes du système antioxydant dont la catalase, après traitement avec des glucanes (Gil-ad et al,., 2001; Kim et al., 2009). Cependant, dans notre étude, l'activité de la catalase n'augmente qu'après trois jours de germination. On pourrait expliquer cette augmentation tardive, par une faible production des ROS par la laminarine. Ainsi, une telle concentration en ROS n'a pas d'effet majeur sur l'expression des enzymes de la catalase dès le début des premières phases de germination. Mais aussi, il peut être expliqué par le temps nécessaire pour l'allongement des racines qui deviennent sensibles au stress du milieu, ce qui induit son expression. De même, l'activité enzymatique de l'ascorbate peroxydase connaît le même profil que celui de l'activité

de la catalase, mais son activité reste plus faible que celle de la catalase. De même, dans les conditions d'un stress abiotique, l'activité de l'ascorbate peroxydase reste faible par rapport à celle de la catalase (Kim et al., 2005). Parmi les enzymes du système antioxydant, la catalase pourrait donc être considérée comme une des enzymes majeures responsables de maintenir un équilibre homéostatique pour le bon fonctionnement de la plante.

Conclusion et perspective

Dans cette étude, nous avons mis en évidence un effet même faible de la laminarine sur la germination des grains de blé. L'accélération de la germination des graines pourrait être expliquée par les propriétés élicitrices de la laminarine, et principalement sur l'expression de l'α-amylase, enzyme marqueur de la croissance lors des phases initiales de la germination.

L'utilisation de substances comme la laminarine semble jouer un rôle d'éliciteur efficace de défenses naturelles chez le blé. Dans la présente étude, l'effet de la laminarine a permis de déclencher et de discriminer l'expression d'un certain nombre de marqueurs. Ainsi, nous avons mis en évidence l'importance des protéines de la 1-Cys-Prx et des gènes de la PR.1.1 dans la protection contre un éventuel stress lié à la présence de pathogènes. Chez les céréales, de par le fait que la 1-Cys-Prx soit spécifique du grain, l'utilisation de substances externes à l'image de la laminarine, constitue un moyen pour stimuler cette protéine, et ainsi améliorer la protection contre les éventuelles attaques des champignons, à l'exemple de la fusariose qui attaque le blé tendre.

Cette étude a permis principalement de discriminer l'implication des marqueurs des rédoxines et ceux du système antioxydant dans l'étude de la physiologie des semences. La 1-Cys-Prx semble être bien placée pour aborder cette physiologie et le stress oxydatif en particulier pendant la germination en présence de stress biotique par rapport aux éléments du système antioxydant. Dans une moindre mesure l'importance des Trxs *h* semble être secondaire, du fait de leur implication dans la mobilisation des protéines. Ainsi, la 1-Cys-Prx peut être considérée comme un marqueur indicateur de l'état redox du grain pendant les premières phases de germination.

L'utilisation de traitements externes avec des substances d'oligosaccharides capables de stimuler les défenses naturelles constitue une stratégie de protection des plantes.

Elle s'avère plus efficace et plus simple que les autres approches de biotechnologies comme l'utilisation des produits chimiques ou la production de plantes transgéniques. Cette démarche qui concilie agriculture et environnement, apparaît particulièrement intéressante. La stratégie qui consiste à stimuler les défenses des plantes à l'aide de composés naturels se démarque en effet de l'utilisation des pesticides, et des synergies peuvent être envisagées entre la stimulation de la plante et l'affaiblissement des pathogènes. L'utilisation de substances comme la laminarine présente un avantage considérable de ne pas mobiliser inutilement et avant l'attaque le métabolisme de la plante en faveur de la défense.

MODULATION *IN PLANTA* DE L'EXPRESSION DES REDOXINES

Les modifications génétiques constituent une innovation importante dans l'étude des gènes et des protéines. L'implication des Prxs et des Trxs *h* a été étudiée *in planta* par voie transgénique dans certains travaux qui ont confirmé leurs rôles dans la protection contre le stress, dans la modulation des protéines de réserve, l'amélioration de la viscosité de la pâte et la diminution des effets négatifs comme l'allergénicité. Chez les céréales, les travaux qui traitent les implications de ces protéines sont encore rares et principalement dans l'amélioration de la qualité germinative.

Notre étude précédente a mis en évidence les différences entre les Trxs *h* du système modèle ainsi que le rôle de la 1-Cys-Prx comme un marqueur du stress plus sensible que la catalase ou l'ascorbate peroxydase. Il nous faut donc maintenant moduler l'expression de ces marqueurs pour à la fois pour avancer dans la physiologie de la semence et valider le système modèle retenu.

Les techniques disponibles nous offrent deux possibilités de moduler l'expression d'un gène, l'imbibition et la surexpression. La technologie ARN antisens a été utilisée comme moyen pour la régulation de l'expression génique dans un grand nombre d'organismes. Depuis l'avènement de l'interférence ARN (RNAi), cette technique s'est peu à peu imposée par sa simplicité et son efficacité. Elle est devenue un outil puissant pour la détermination des fonction des gènes. Pour notre part, nous nous situerons dans la voie ouverte par des auteurs qui ont apporté une nouvelle souplesse à la technique d'interférence en utilisant des fragments d'ADN au lieu des fragments d'ARN double brin (Voinnet et al., 1998, Palauqui et al., 1999, (Kawai-Toyooka et al., 2004, Rutherford et al., 2004). Pour obtenir le fragment d'ADN, un couple de primers suffit.

Dans notre étude, nous utilisons cette méthode pour la modulation par inhibition des trois isoformes de Trxs *h* et une Grx au stade plantule du blé afin de déterminer l'effet phénotypique d'une telle inibition afin d'évaluer par là même la spécificité des isoformes retenus dans le modèle.

Quant à la surexpression des gènes, la littérature montre que la transformation via *Agrobacetrium tumefaciens* (Shrawat et Lorz, 2006) est la plus indiquée pour le blé. La Trx *h*l se présente comme le candidat idéal pour vérifier ses capacités réductrices et oxydantes au niveau de la plantule ainsi qu'au niveau de la qualité technologique et germinative de la graine. Cette transformation doit être acompagnée de celle par la Trx *h*2 qui sera utilisée comme Trx *h* standard.

MODULATION DES REDOXINES PAR INTERFERENCE ADN

La génétique inverse est devenue une approche de choix pour identifier le rôle de certains gènes impliqués dans le développement des plantes et dans l'élaboration de la qualité de la matière première. La technologie basée sur l'interférence par ARN (RNAi) en est l'exemple le plus emblématique. Le principe consiste à introduire des fragments d'ARN double brin dans un organisme ou une cellule. La Figure 35 montre le mécanisme d'interférence ARN.

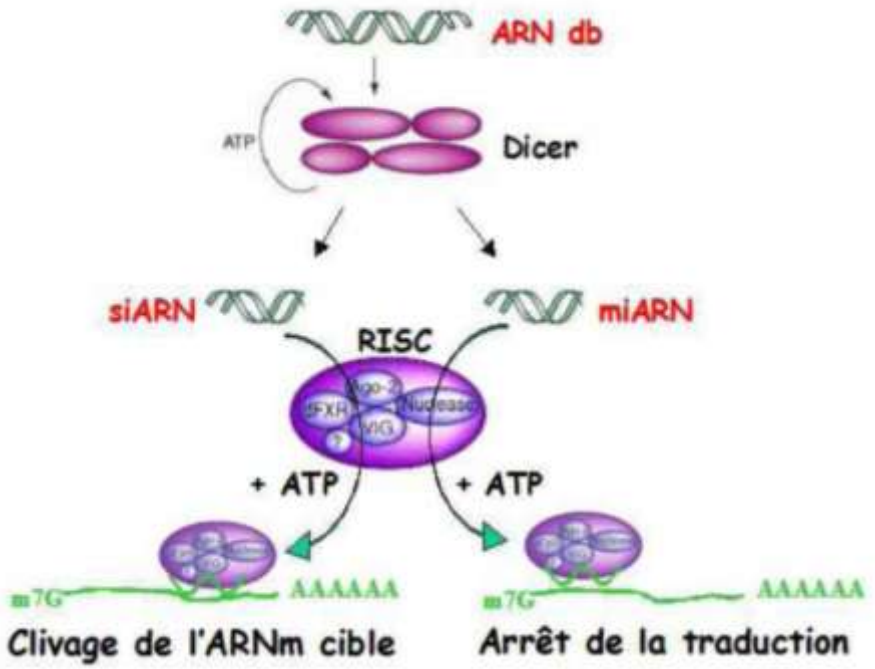


Figure 35 : Fonctionnent classique de la machinerie de l'ARN interférence (http://biotech-medecine.com/archives/review27/actu).

Les molécules d'ARN double brin sont d'abord découpées par une RNase double brin, l'éminceuse (Dicer) produisant des fragments d'environ 21-23 nucléotides, les petits ARN interférant (*short interfering RNA*, siRNA). Ces petits ARN sont ensuite incorporés sous forme de simple brin dans un complexe ribonucléoprotéique (RISC) où ils servent de guide pour la reconnaissance de la cible. L'interférence a lieu quand l'un des brins est susceptible de s'hybrider de manière spécifique avec un ARNm pour induire la suppression de l'expression génique de cette cible. Cette inhibition peut donc avoir lieu au niveau du cytosol par dégradation de l'ARNm ou par inhibition de la traduction (Hannon et al., 2002; Vaucheret et al., 2001). L'un des avantages de ce procédé, est qu'il n'est pas restreint à une cellule mais s'étend aux cellules voisines grâce aux petits ARN eux même (Dunoyer et al., 2010). Ainsi, il

n'est pas nécessaire d'avoir une intégration stable d'un transgène, car une expression transitoire est suffisante pour induire le phénotype correspondant à l'inhibition de l'expression génique.

Quelques travaux avaient ouvert cette voie en montrant que des ADN double brin, dépourvus de promoteur, pouvaient induire l'inhibition de l'expression génique chez les plantes (Voinnet et al., 1998; Palauqui et al., 1999; Rutherford et al., 2004, Nowak et al., 2009). Des équipes, surtout dans le milieu médical, montrent un intérêt grandissant pour les systèmes à base d'ADN.

Le travail présenté dans ce chapitre s'inscrit dans ce sens, puisqu'il consiste à inhiber les trois Trx *h* et la Grxs du système modèle au stade plantule du blé. Il s'agit de déterminer si l'on pouvait mettre en évidence au niveau de l'expression des gènes et au niveau phénotypique un possible effet de l'inhibition. Ainsi si on pouvait évaluer en deuxième lieu la redondance et/ou la spécificité des isoformes de la Trx *h*. En troisième lieu, d'évaluer les éventuelles interactions des Trxs *h* entre elles et les interactions entre les Trx *h* et la Grx afin de poser les bases d'un modèle réactionnel.

Pour atteindre ces objectif et en s'appuyant sur les données de la littérature, une méthode simple a été mise au point pour inhiber l'expression des gènes ciblés (Trx *h*1, *h*2, *h*3 et Grx) par interférence ADN en utilisant l'injection du gène entier ou de petits fragments d'ADN double brin de séquence spécifique à la cible.

L'analyse phénotypique a été faite par le suivi du développement des plantules et l'expression des gènes, par qRT-PCR à partir des ARN totaux et l'expression des protéines de Trx *h* par westren blot.

1 Matériels et méthodes

1.1 *Préparation de l'ADN interférant*

1.1.1 Gènes de thiorédoxines et de glutarédoxines

Les transcrits des Trx *h*1 *(*AY072771*),* Trx *h2 (*AF286593*),* Trx *h3* (AF420472) et Grx (EU823285) du blé tendre (*Triticum aestivum*, cv Soissons) sont amplifiés par PCR à partir de clones maintenus au laboratoire d'agrophysiologie. L'amplification est réalisée à l'aide de 2 unités de la polymérase *pfu* (Promega) dans un tampon commercial (Promega), avec 200µM de chaque dNTP, 0,5 µM de chaque amorce et 1 ng d'ADN dans volume final de 25µl.

Les amorces sont indiquées dans le

Tableau **3** ci-dessous :

Amorces	Séquences
Trx *h1*	5'-ACATGGCTAATGGCAAGGAGA-3' 5'-CGTTGTATGCTTCAGCGACGT-3'
Trx *h2*	5'-GCTATCAAGGAGGAACTGACGAA-3' 5'-AAAACACACTAGCTTGGATTAAGCAA-3'
Trx *h3*	5'-TGTCGGAGCTATCAAGGAGGAG-3' 5'-CTTGATTCACCATCATAAACTC-3'
Grx	5'-AGTCCAGAGCTATGGCGCTC-3' 5'-CTAAGGAGTGACGGTGGTCTTC-3'

Tableau 3 : Les amorces utilisées dans l'amplification des gènes Trxs et Grx.

La PCR est réalisée dans un thermocycleur Applied BioSystems 9700 dans les conditions suivantes : 1cycle à 95°C pendant 3 minutes; 30 cycles à 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 30 secondes; 1 cycle. Les échantillons contenant les amplicons de Trx *h1*, Trx *h2*, Trx *h3* et Grx sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Les bandes de 400bp qui correspondent aux ADN des Trx *h1*, Trx *h2*, Trx *h3* et Grx sont alors coupées et purifiées par le Kit de purification Qiagen dans un volume de 10 µl.

1.1.2 Les petites ADN double brin (siADN)

Les petits ADN double brin (siADN) ont été dessinés par le programme SiRNA (bioweb2.pasteur.fr) à partir de la séquence ARNm. Les solutions (50 µM) de siADN ont été préparées par hybridation des amorces correspondantes (

Tableau **4**) avec leur brin complémentaire dans un thermocycleur par un gradient de température de 90°C à 40°C pendant 15 minutes.

Amorces	Séquences
Trx *h1*	Sens: 5'-AAGAAGCTGGTGGTCATTGACTT-3' Antisens: 3'-AAGTCAATGACCACCAGCTTCTT-5'
Trx *h2*	Sens: 5'-AACTTCAGACATTTGCACCGGTT-3' Antisens: 3'-AACCGGTGCAAATGTCTGAAGTT-5
Grx	Sens: 5'-AAGAAGTTGTTCACGCAGCTGGG-3' Antisens: 3'-CCCAGCTGCGTGAACAACTTCTT-5'

Tableau 4 : Les amorces utilisées pour la préparation des petits ADN double brin (siADN).

1.2 *Matière végétale*

Une centaine de grains de blé Soissons placés dans un Falcone de 50 ml sont trempés dans de l'hypochlorite de sodium à 10% pendant 20 à 30 minutes. Ensuite ils sont lavés 2 fois dans de l'eau stérile puis une fois dans une solution d'acide chlorhydrique (10mM). Ils sont finalement lavés 5 fois avec de l'eau stérile.

Les grains sont semés en condition stérile c'est-à-dire sur papier filtre wattman humide dans des boites de Pétri et ils sont mis à germer dans un phytotron (Fisher bioblock Scientific), entre 72-96 heures sous 200 µmol. m^{-2}. s^{-1}, avec une photopériode de 16h et un gradient de température jour/nuit de 23/20°C.

Les graines germées sont ensuite transplantées à raison de quatre unités par pot dans un terreau commercial stérile. Avant l'ouverture de la première feuille (environ quatre jours de germination) (Figure 36), 5 µl de la solution d'interférence, siADN ou de l'eau stérile sont injectées dans la première feuille, elles sont replacées dans le phytotron. L'expression des gènes de Trx *h1*, Trx *h2*, Trx *h3* et Grx est analysée à 8h, et à 96h.

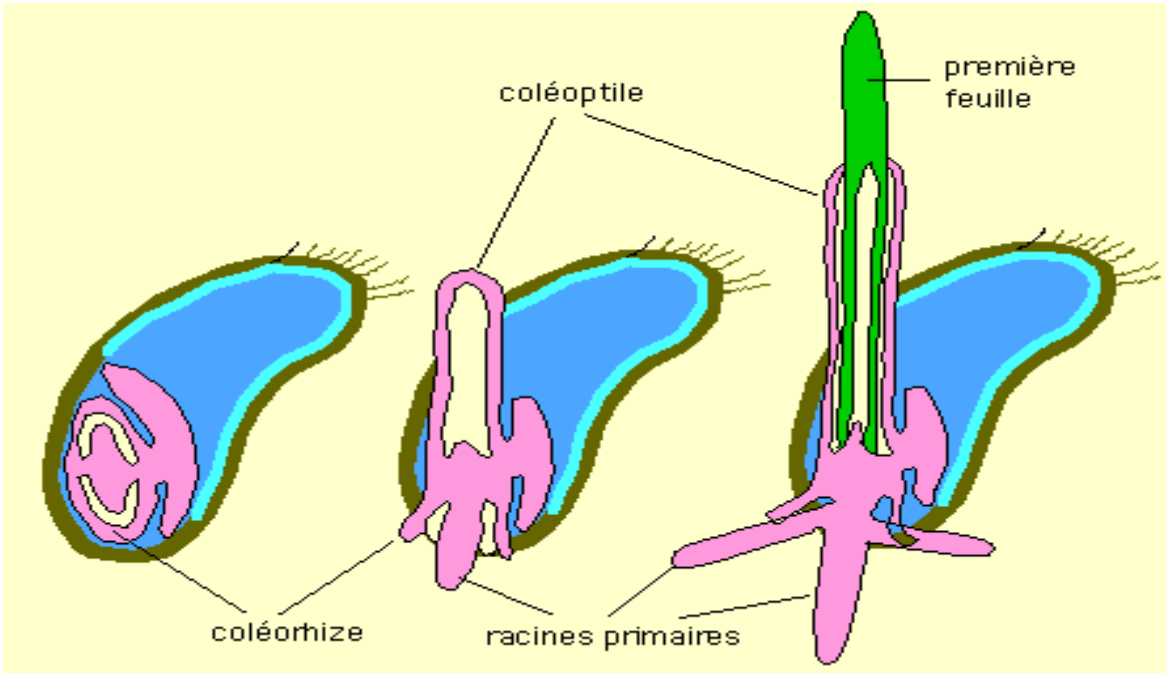


Figure 36 : Germination du grain de blé (Muller et Wieser, 1995).

1.3 *La quantification relative de l'expression génique par PCR en temps réel*

Le protocole d'extraction d'ARN a été décrit dans le chapitre «l'effet d'un éliciteur sur l'expression des marqueurs du système modèle lors des premières phases de la germination du blé» (Voir page 91).

Les gènes des Trx *h*1 *(*AY072771*),* Trx *h2 (*AF286593*),* Trx *h3* (AF420472) et Grx (EU823285) du blé tendre (*Triticum aestivum*, cv Soissons) sont amplifiés par PCR à partir de clones (Cazalis et al., 2006). L'amplification est réalisée à l'aide de 2 unités de la polymérase *pfu* (Promega) dans un tampon commercial (Promega), avec 200µM de chaque dNTP, 0,5 µM de chaque amorce et 1 ng d'ADN dans volume final de 25µl.

La PCR est réalisée dans un thermocycleur Applied BioSystems 9700 dans les conditions suivantes : 1cycle à 95°C pendant 3 minutes ; 30 cycles à 95°C pendant 30 secondes ; 60°C pendant 30 secondes; 1 cycle à 72°C pendant 7 minutes. . La quantification relative d'un gène donné est exprimée, après normalisation par l'expression de l'ARNr 18S (5'-AGTAAGCGCGAGTCATCAGCT3'; 5'-CATTCAATCGGTAGGAGCGAC-3') utilisé comme contrôle interne, en pourcentage de l'expression d'une référence par la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2004).

1.4 *Analyse par western blot*

Des graines de blé sont mises à germer dans des conditions stériles. A la sortie de la première feuille, 5 µl des siADN de la Trx *h*1, de la Grx et le mélange équimolaire des Trx *h* (Trx *h*1, *h*2 et *h*3) ont été injetcés. Des témoins positifs en injectant de l'eau stérile et des témoins négatifs sans aucune injection ont été également préparés. Des prélévements ont été réalisées à différents moments de la germination (24h, 48h, 72h et 96), et les protéines sont extraites dans un tampon contenant 50 mM Tris-Hcl (pH 8), 1 mM d'EDTA et 0,5 mM de PMSF. Les protéines sont ensuites concentrées grâce à un évaporateur concentrateur. 35 µg de protéines ont été utilisées pour réaliser des analyses western blot. L'expression des protéines de la Trx h1, a été suivie en utilisant des anticorps Anti-Trx h2 du pois (*pisum sativum*), couplés avec des anticoprqs antiRabbit Ig G (sigma). La révélation a été réalisée grâce au substrat (Sigma FAST^{TM} 5-Bromo-4-chloro-3indolyl phosphate/Nitro Blue Tetrazolium Tablets).

2 Résultats

2.1 *L'expression des gènes*

L'expression des gènes a été analysée par qRT-PCR en temps réel à partir des ARN totaux du matériel végétal. L'expression est mesurée à 8h et 96h en faisant l'hypothèse que ce mode d'inférence génère au moins une inhibition temporaire. Ceci permettra d'évaluer ainsi la durée de vie de cet effet. Le profil d'expression des gènes cibles chez les plantules témoins montre que, dans les conditions de l'expérience, la Trx *h1* est la plus exprimée, Trx *h2* et *h3* ont un niveau d'expression similaire et supérieure à celle de la Grx (Figure 37).

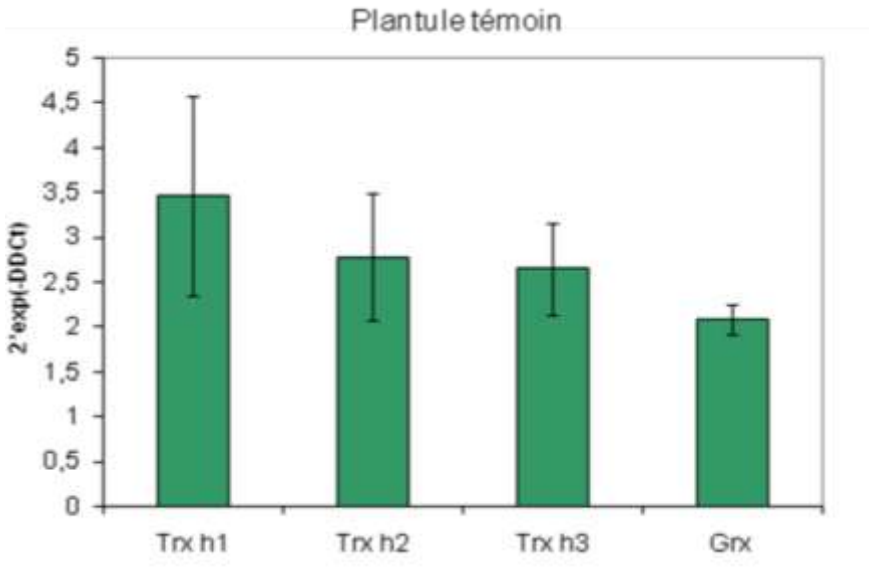


Figure 37 : Profil d'expression des gènes cibles de la plantule témoin après 96h de la germination dans les conditions de l'expérience

2.1.1 Inhibition par Trx h1

L'analyse de l'expression des gènes après une injection de Trx *h* ou de Grx sous la forme geADN ou siADN montre que ce système est susceptible de générer une modulation de l'expression du gène en question mais il module également celle des autres gènes ciblés. Ainsi, l'interférence par la Trx *h1* sous la forme de siADN induit une inhibition quasi complète du gène 8h après le traitement ainsi qu'à 96h. La Trx *h1* siADN induit également une inhibition complète des autres gènes ciblés après 8h, par contre on observe une faible reprise de l'expression des ces derniers à 96h et en particulier pour la Grx (Figure 38, Figure 39). Le traitement par geADN montre un profil différent. L'inhibition de Trx *h1* atteint 75% à 8h et n'est plus qu'à 65% à 96h, indiquant un contournement de l'interférence, contrairement à ce qui est observé avec le siADN.

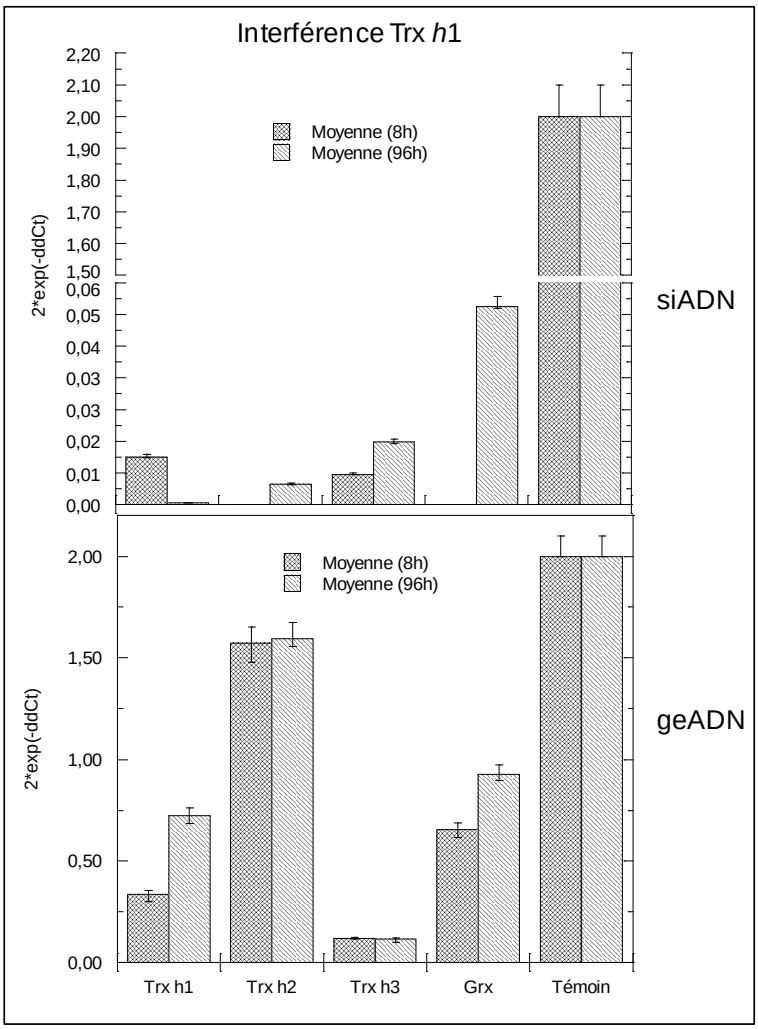


Figure 38 : Profil d'expression des gènes inhibés par Trx *h1* siADN et geADN.

A	SiADN	8 h	96 h		geADN	8 h	96 h	B
	h1	99,25	100		h1	85	62,5	
	h2	100	100		h2	20	20	
	h3	99,5	99,5		h3	93,8	93,8	
	Grx	100	97,5		Grx	70	60	

Figure 39 : Pourcentages d'inhibitions après l'injection de la Trx *h*1. siTrx *h*1(A), geTrx *h*1 (B).

Parmi les autres particularités, l'expression de Trx *h3* reste inhibée à 90% même à 96h, et par conséquent, l'effet de l'interférence semble plus efficace sur Trx *h3* que sur Trx *h1*. La Grx a un profil similaire à celui de laTrx *h1* tandis que l'expression de laTrx *h2* est la moins affectée par cette méthode avec 20% d'inhibition.

2.1.2 Inhibition par Trx h2

L'injection de Trx *h2* induit un profil d'inhibition similaire à ce qui a été observé précédemment avec quelques particularités (Figure 40, Figure 41).

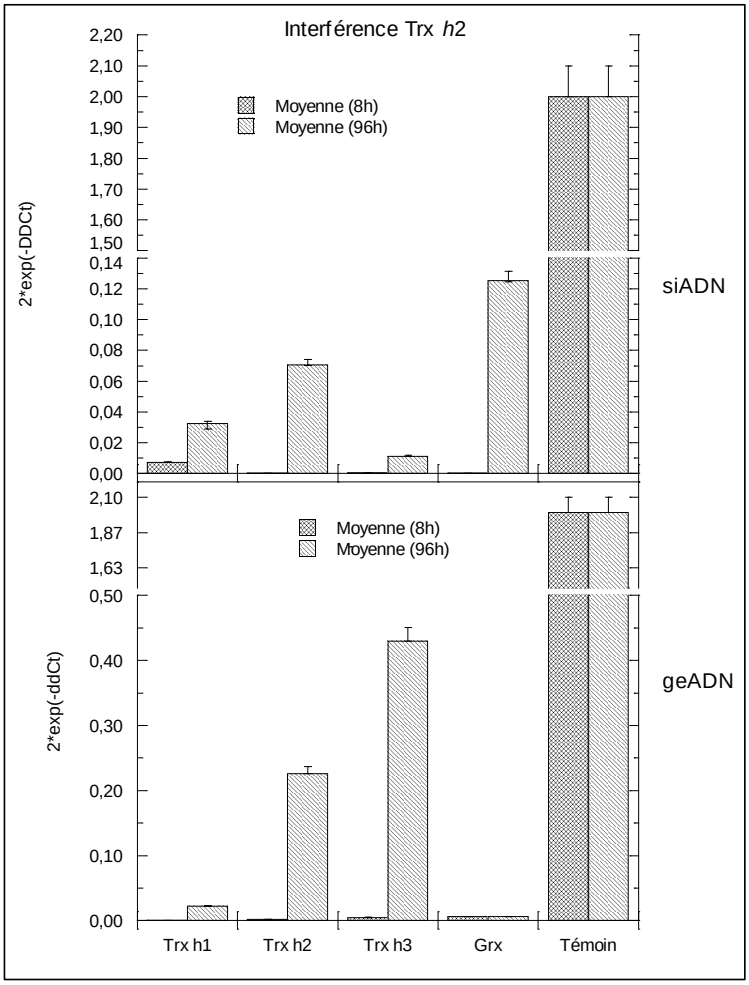


Figure 40 : Profil d'expression des gènes inhibés par Trx *h2* siADN et geADN entre 8h et 96h après traitement.

A	SiADN	8 h	96 h		geADN	8 h	96 h	B
	h1	95,5	98,5		h1	100	99	
	h2	100	96,5		h2	100	87,5	
	h3	100	99,5		h3	100	79,5	
	Grx	100	94		Grx	100	100	

Figure 41 : Pourcentage d'inhibition après l'injection de la Trx *h*2. siTrx *h*2 (A), geTrx *h*2 (B).

En premier lieu, l'efficacité de l'inhibition par geADN est plus grande qu'avec la Trx *h1* et est quasiment du même ordre que celle du siADN. On constate l'inhibition totale à 8h et un début de contournement de l'interférence à partir de 96h. L'essai d'inhibition par injection de Trx *h3* donne également le même profil (résultat non montré).

De ces trois essais d'inhibition, celle avec le siADN de la Trx *h1* est la plus efficace, non seulement sur la Trx *h1* mais aussi sur les autres gènes cibles. Ces résultats font partie d'un certain nombre d'indices qui plaident en faveur d'un rôle particulier de ce gène par rapport aux deux autres.

2.1.3 Inhibition par Grx

L'injection de la Grx sous la forme siADN a la particularité de provoquer l'inhibition totale des 3 Trx *h* jusqu'à 96h, tandis que l'on observe un début de la phase de contournement à 96h (Figure 42, Figure 43).

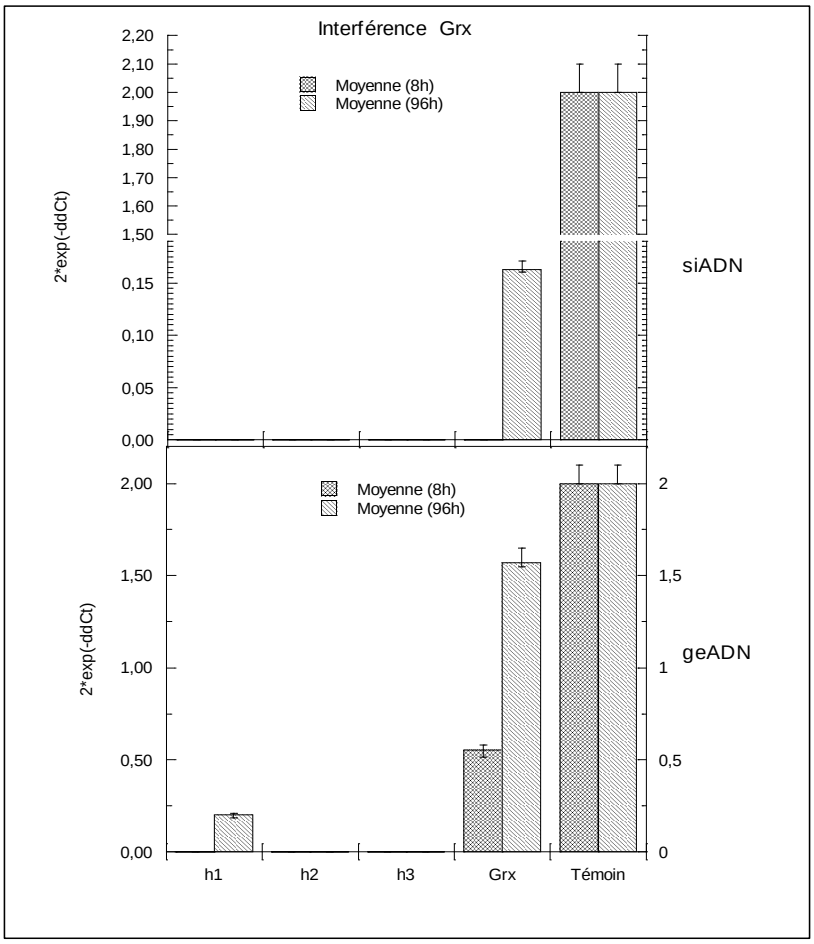


Figure 42 : Profil d'expression des gènes inhibés par Grx siADN et geADN entre 8h et 96h après traitement.

A

SiADN	Grx	Grx
h1	100	100
h2	100	100
h3	100	100
Grx	100	91,5

B

geADN	Grx	Grx
h1	100	90
h2	100	100
h3	100	100
Grx	70	20

Figure 43 : Pourcentages d'inhibitions après l'injection de la Grx. siGrx (A), geGrx (B).

L'effet de l'interférence de Grx sur la synthèse des Trxs *h* et le contrôle de l'inhibition pour Grx sont confirmés par la forme geADN dans la mesure où à 96h, l'inhibition n'est plus que de 25%. L'inhibition par le mélange équimoléculaire des différents interférents ainsi qu'un volume de 15 µl de Grx ont le même effet, c'est-à-dire une inhibition totale de la synthèse de tous les gènes, ce qui est corrélé avec l'arrêt du développement de la plantule.

2.2 *Expression des proteins des Trx hs*

Les résultats de l'expression des protéines des Trx *h*s obtenus par western blot grâce à l'anticorps anti-Trx *h*2*PS* (*Pisum sativum*), ne montre pas une inhibition de l'expression des protéines aussi importante qu'après injection des siADN des Trx *h*1, du mélange équimolaire des Trx *h* (*h*1, *h*2 et *h*3) et de Grx (Figure 44A, B et C).

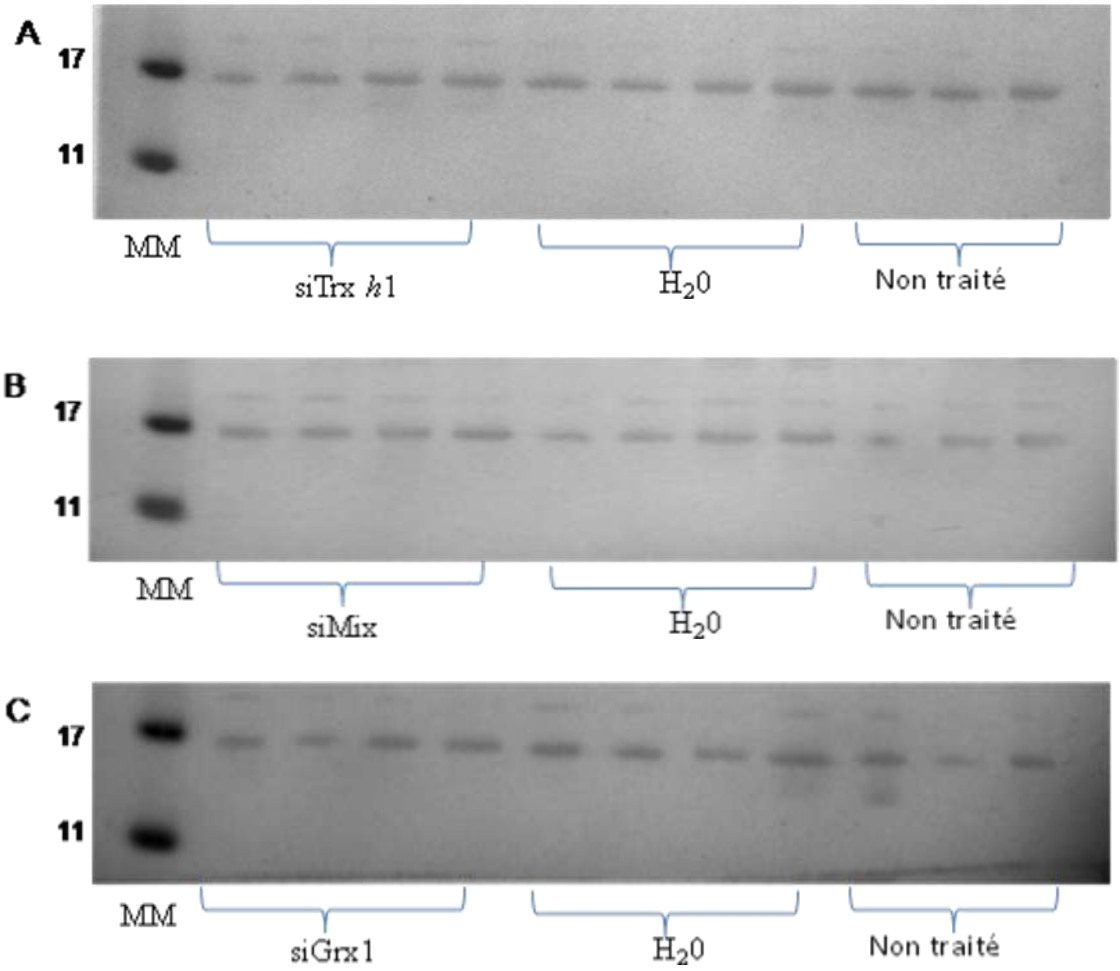


Figure 44 : Suivi de l'expression des protéines de Trx *h* par western blot, en utilisant des anticorps-anti Trx *h2* du pois (*Pisum sativum*). Les protéines totales ont été extraites à partir des feuilles de plantules, à différents moments (24h, 48h, 72h et 96h), après les injections des SiADN respectivement de Trx *h*1 (A), du Mix (Mélange équimolaire de Trx *h*1, 2 et 3) (B) et de la Grx1 (C). Un contrôle positif a été réalisé par l'injection de volumes d'eau distillée, équivalents à ceux des SiADN. Les contrôles négatifs correspondent aux plantules non injectées.

Il s'agit d'une très légère inhibition pendant les premières 48h qui suivent les injections (Figure 44A et B), avant que cette expression ne retrouve son niveau des échantillons témoins. Les anticorps antiTrx *h*2PS ont été utilisés, car ils reconnaissent d'une manière spécifique les protéines recombinantes des Trx *h*1, *h*2 et *h*3 (Figure 22).

2.1 *Analyse phénotypique*

Les plantules du blé (cv Soissons) retenues dans l'expérimentation ont été choisies sur la base de leur homogénéité phénotypique. Les essais (geADN, siADN) et les témoins (H_20) sont traités et le développement des plantules a été suivi au-delà de 96h. D'une manière générale, on observe que les essais ont un développement normal comparé aux témoins, mais leur croissance est un peu plus lente. La croissance, évaluée sur la base de celle de la première feuille, est d'autant plus lente qu'on est proche de t=0 de l'injection. On note par exemple qu'une interférence par geADN de la Trx *h*1 génère une différence de 2-3cm entre le témoin et l'essai 72h après traitement (Figure 45). Le traitement par siADN a un effet plus inhibiteur de la croissance que celui par geADN. Après 96h et lors d'une injection de 5µl, qui est celle qui a été retenue lors de la mise au point de la méthode, les plantules essais deviennent peu à peu indiscernable par rapport aux témoins.

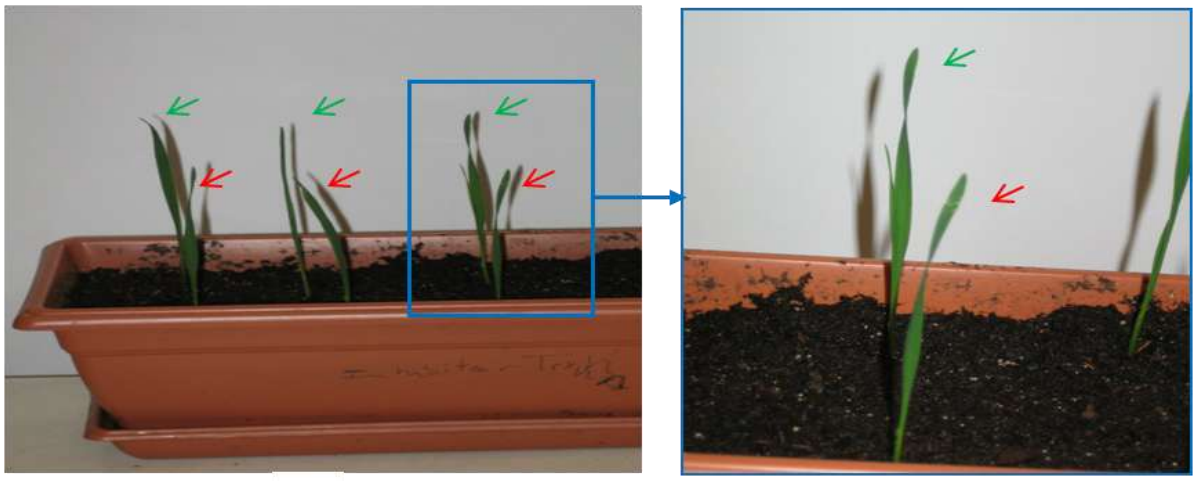


Figure 45 : Différence de développement entre témoin (←) essai (←) 72h après traitement par geADN de Trx *h1*. B. détails de la différence de croissance de la première feuille.

Si après 96h, on transfère les deux types de plantules dans un phytotron dans les mêmes conditions, mais avec un gradient de température jour/nuit de 37°/28°C, on constate que les plantules des essais ont un phénotype pâle par rapport aux témoins. Cela signifie que les effets de l'inhibition sont encore perceptibles après 96h. Cependant, les plantules retrouvent rapidement le phénotype des témoins. Les observations montrent également que le phénotype des plantules varie en fonction de la nature et de la dose des solutions d'interférence.

Ces résultats préliminaires montrent que les méthodes d'inhibition par geADN et siADN des Trxs *h* et de la Grx, comme utilisées dans cette étude, sont capables d'affecter d'une manière limitée le développement de la plantule. En outre, elles suggèrent un lien direct ou indirect entre l'expression de ces gènes et l'intégrité de l'appareil foliaire mise en évidence par le stress thermique, et dans une certaine mesure, la dose d'interférant ou l'interférence multiple.

3 Discussions

Les résultats préliminaires obtenus grâce à ces expériences ont un effet sur les plantules causé par l'interférence ADN. Cependant, la méthode développée nécessite une étude plus approfondie. L'injection des siADN et des geADN montre une extinction de l'ensemble des gènes de rédoxines étudiées (thiorédoxines *h* et glutarédoxine). Cela rend difficile l'interprétation des résultats en particulier quant à la spécificité des interférant vis-à-vis de leur cible. Il semble que l'ADN interférant reconnait une multitude d'ARNm. Ainsi, pour confirmer ces résultats et valider la méthode mise en place, l'injection contrôle d'ADN (« si » ou « ge ») ciblant un gène absent du génôme de l'organisme étudié (i.e. gène codant la Green Fluorescent Protein) semble indispensable. Malgré ce manque, une interprétation de ces résultats préliminaires peut être réalisée. On observe ainsi, une plus grande efficacité des siADN par rapport aux geADN à inhiber l'expression des gènes cibles.

Dans les conditions de cette expérimentation, en dépit du choix des séquences utilisées pour générer les phénomènes d'interférences, il est difficile d'inhiber un gène unique dans les conditions utilisées. Ceci peut être dû à la proximité des séquences des isoformes. En retournant l'argument, cette technique offre donc la possibilité d'inhiber une famille génique telle que les Trx ou les Grx à l'aide d'un unique siADN.

Au contraire de l'effet de l'inhibition des transcrits des rédoxines par les siADN, l'inhibition de l'expression des protéines n'est pas aussi importante que les gènes des rédoxines étudiés. Le maintien de l'expression des protéines, peut être expliqué par le turn-over plus lent des protéines, ou encore que d'autres isoformes de Trxs *h* compensent la synthèse des protéines des Trxs *h*. Il faut signaler que l'anticorps anti-Trx *h*2*PS*, ne révèle la présence que d'une seule bande de Trx *h* dont les gènes sont inhibés. Ce qui rend difficile le suivi de l'expression de chaque protéine. Ainsi, le suivi de l'expression des protéines

nécessiterait certainement, l'utilisation des anticorps spécifiques pour chaque protéine de Trxs *h*.

Cette étude avait également pour objectif de répondre à la question de la possibilité de mettre en évidence un effet phénotypique de l'inhibition de Trxs *h* par interférence. En effet, des travaux similaires entrepris sur *Arabidopsis* ont montré qu'apparemment, l'inhibition sélective de Trx *h* n'avait aucun effet phénotypique (Yves Meyer, communications personnelles). Cette absence d'effet pouvait être interprétée par une réaction de compensation due au nombre d'isoformes de la Trx *h* chez *Arabidopsis*. Concernant le blé, et les céréales en général, une surexpression de Trx *h* au niveau du grain chez l'orge (Wong et al., 2004) ou une inhibition par la technologie anti-sens de la Trx *h* chez le blé (Guo et al., 2007) avait des effets mesurables sur la germination et la taille des agrégats protéiques. Ce qui montre que la modulation de l'expression des Trxs *h* au niveau du grain est mesurable en termes physiologiques. Dans ces travaux, nous montrons que l'inhibition de Trx *h* ou de Grx induit un retard très limité dans le développement.

Elle se traduit en outre par une vulnérabilité au stress oxydatif généré par un stress thermique. Les Trxs *h* et les Grxs en particulier sont connues dans le maintient de l'état redox intracellulaire, et leur potentiel comme facilitatrices et régulatrices de la conformation de protéines et d'activité chaperonne (Berndt et al., 2008). Il ne serait pas étonnant que l'inhibition de ces censeurs de l'état redox cellulaire ait des conséquences sur le métabolisme en général.

La première donnée de ces résultats préliminaires, et si ce résultat sera confirmé lors de l'utilisation de contrôles extrernes, est l'impact de l'inhibition de la Grx sur celle des Trxs *h*. Les Grxs cytosoliques réduit les protéines glutathionylées et interviennent dans le maintient du statut redox des protéines pendant un stress oxydatif. Une étude récente montre qu'une inhibition de la Grx1 aggrave le disfonctionnement mitochondrial dans un modèle animal de maladie neurodégénérative, telle que la maladie de Parkinson. La Grx1 intervient donc dans le maintient de l'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie. (Saeed et al., 2008). Des fonctions similaires peuvent être évoquées dans le présent cas. On connaît également un cas où la Trx *h* est réduite par le système GSH/Grx (Gelhaye et al., 2003). Les résultats suggèrent une évidente dépendance des Trx *h* étudiées par rapport à la Grx, par conséquent les cas de réduction de la Trx *h* par la Grx/GSH doit être plus répandue qu'on ne le croit.

L'inhibition observée avec les gènes montre que ce système est fonctionnel. L'inhibition observée par le biais de geADN suggère que le double brin ADN est susceptible d'être reconnu par l'équivalent de la RNase Dicer (Montrichard et al., 2003, Nowak et al., 2009), enzyme très conservée chez les champignons, plantes, mammifères, nématodes et insectes (Serrato et al., 2001). Il doit être ensuite découpé en petits siADN, et ceux-ci sont enfin incorporés sous forme simple brin dans le complexe ribonucléoprotéique dénommé RISC (RNA-induced silencing complex) où ils servent de guide pour la reconnaissance de la cible (Hammond et al., 2000). L'action des siADN est beaucoup plus marquée que celle des geADN et mériterait d'être comparé à celle des siARN pour évaluer leur différence.

Conclusion et perspectives

Dans cette étude, en nous basant sur les données de la littérature, nous avons mis au point une méthode simple à mettre en œuvre et efficace pour inhiber l'expression des gènes ciblés (Trx *h1*, *h2*, *h3* et Grx) par interférence ADN. Ceci est réalisé après injection soit du gène entier soit des petits fragments d'ADN double brin d'une vingtaine de paire de bases sur le modèle des siARN. L'inhibition de l'expression des gènes, à un effet sur le développement des plantules. Cet effet reste limité dans le temps, puisque les plantules retrouvent rapidement un développement identique aux plantules témoins.

Les résultats obtenus sont encourageants, mais pour valider définitivement ces résultats et donc la méthode développée, d'autres travaux sont nécessaires. D'abord, une répétition de l'expérience en suivant l'expression d'autres gènes que les rédoxines pour s'assurer que les siADN et/ou les geADN ciblent bien l'ARNm du gène en question. Cela permettrait de confirmer ou d'affirmer les interactions observées entre les isoformes de Trx *h* et entre les Trxs *h* et la Grx. Toujours dans le cadre de vérifier l'efficacité de cette méthode dans l'inhibition de l'expression des gènes, une analyse northern blot des petites ARN doit être réalisée. Cela permettrait de confirmer les résultats obtenus par qRT-PCR. Pour analyser le rôle de la Grx sur l'expression des Trxs *h*, il faudrait faire une inhibition de la thiorédoxine réductase (NTR), enzyme qui réduit donc la Trx *h*, de manière à évaluer sa contribution réelle dans l'activation de sa cible. Des travaux récentes ont montré que les voies de NTR/Trx *h* et GSH/Grx sont redondantes (Bashandy et al., 2010). Un travail plus fondamental est également à faire pour comprendre au niveau moléculaire, la prise en charge des siADN par les enzymes de type Dicer et le complexe RISC, même si derniérement, il a été montré que des fragments d'ADN sont reconnus par le DICER (Nowak et al., 2009).

Suite à la mise en place d'une méthode simple et efficace pour la transformation du blé par *Agrobacterium*, Il serait peut être plus judicieux d'utiliser cette méthode pour réaliser l'inhibition de l'expression des gènes de rédoxines et cela par interférence ARN (ARNi). Sachant que cette méthode utilise des plantules pour réaliser la transformation. Toujours dans le cadre de la modulation de l'expression des gènes, La modulation par surexpression de ces rédoxines serait un moyen pour améliorer la résistance des plantes aux conditions environnementales et d'une manière générale contre le stress oxydatif.

METHODE SIMPLIFIEE DE TRANSFORMATION DES CEREALES PAR AGRBACTERIUM TUMEFACIENS

Les techniques de transformations des plantes utilisent principalement des souches *Agrobacterium* (*Agrobacterium tumefaciens*), elle constitue une méthode naturelle et optimale dans l'intégration des gènes d'intérêt dans le génome des plantes. Mais il existe un grand nombre d'approches pour le transfert de gènes dans les cellules végétales. La technique de bombardement grâce à des particules est aussi utilisée, il s'agit d'une méthode directe de transfert de gènes. Cette méthode a été beaucoup utilisée au tout début des essais de production des plantes transgéniques.

La transformation des monocotylédones via Agrobacterium n'a été possible que récemment. Hiei et al., 1994, ont produit des plantes transgéniques du riz par *Agrobacterium*, avec une transformation stable et efficace sur trois générations (R0, R1 et R2). Ce travail a représenté une percée dans les biotechnologies des céréales, permettant ainsi d'utiliser *Agrobacterium* dans la transformation des céréales comme le maïs, le blé et l'orge (Shrawat et Lorz, 2006; Goedeke et al., 2007).

Aujourd'hui, les deux méthodes peuvent être utilisées pour produire des plantes transgéniques avec des caractéristiques agronomiques importantes. La technique de bombardement par des particules, permet de développer différentes stratégies de transformation et une large gamme d'expression de gènes. Néanmoins *Agrobacterium* reste la meilleure méthode pour obtenir des plantes transgéniques, avec un faible nombre de copies et une transformation stable au cours des générations. Malgré les améliorations pour rendre les espèces de céréales facilement transformables génétiquement, les protocoles de transformations restent fastidieux. La méthode utilisée actuellement, nécessite un protocole difficile à mettre en place, pour produire des plantes transformées (Shrawat et Lorz, 2006).

Actuellement, les techniques de transformation des céréales font l'objet de nombreuses recherches. Parmi lesquelles, le développement des vecteurs binaires polyvalent (Hammelbach et al., 2007), l'utilisation de nouveaux tissus ou explants, ou encore l'utilisation des éléments régulateurs (Cis-element) au niveau du promoteur, pendant la construction des vecteurs, pour suivre l'expression du gène d'intérêt (Barajas-Lopez et al., 2007). La méthode mise en place dans ce travail, s'inscrit dans ce sens pour simplifier la transformation génétique des céréales. L'objectif de la mise en place d'une telle méthode est de surexprimer la Trx *h*1, pour mesurer son implication dans la gestion du stress oxydatif.

EFFICIENT TRANSFORMATION OF CEREALS MEDIATED BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

A ZAHID, JA TRAVERSO AND R CAZALIS

PLANT CELL REPORTS, (2009) (SOUMIS)

Plant Cell Reports



Manuscript for Review

Efficient transformation of cereals mediated by Agrobacterium tumefaciens

Journal:	*Plant Cell Reports*
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Zahid, Abderrakib; EI Purpan, plant molecular biology Traverso, Jose Angel; UPR2355-CNRS, Institut des Sciences du végétal Cazalis, Roland; EI Purpan, plant molecular biology
Keywords:	Agrobacterium tumefaciens; Arabidopsis thaliana; Cereals; Maize; Monocotyledons; Sorghum Transgenic; Transformation; Wheat
Section:	2. Genetic Transformation and Hybridization

scholarONE Manuscript Central

Review

Efficient transformation of cereals mediated by Agrobacterium tumefaciens

Abderrakib Zahid[1], Jose Angel Traverso[2] and Roland Cazalis[1]

[1]. Université de Toulouse ; Ecole d'Ingénieurs de Purpan ; Laboratoire d'Agro-Physiologie; UPSP/DGER 115; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France

[2]. Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, 18008. Granada, Spain.

Actual address: Institut des Sciences du végétal, UPR2355-CNRS Bt23, Centre National de la Recherche Scientifique, F-91198 Gif/Yvette cedex, France

Corresponding author:

Roland Cazalis

Tel: 33-561 15 28 89

Fax: 33-561 15 30 60

roland.cazalis@purpan.fr

For Peer Review

Abstract

Seeds from three varieties of cereals (wheat, maize and sorghum) were tested for their aptitude to be transformed at early stages of germination by *Agrobacterium tumefaciens,* which promotes singular integration patterns, entailing lower mutational consequences for the transgenic plant and limited transgene silencing. Seeds were processed at different stages of germination by a cassette containing the GUS reporter gene under the control of pea thioredoxin h or of a high molecular weight glutenin subunit promoter. Transgene integration and expression into the host organism were followed by PCR and by histological staining. Results showed that the cereals used could be effectively transformed by this method and that the foreign gene behaviour in the progenies was similar to that reported from the standard method, which uses explants and tissue culture. This simplified protocol is easy to use and allows savings in time and reagents. Moreover, it avoids the complex stages of tissue culture and plant regeneration. Because seeds are the main form of planting material for crop production, this technique can be extended to virtually any plant carrying orthodox seeds.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; *Arabidopsis thaliana*; Cereals; Maize; Monocotyledons; Sorghum Transgenic; Transformation; Wheat.

For Peer Review

INTRODUCTION

Cereals represent crops of great importance since they provide more than two-thirds of the world's food supply (Borlaug 1998). Demographers forecast that growth of the world population will be lower than expected, but feeding a world of 10 billion people in the 21st century remains a challenge (Borlaug 2004) since it still requires more calories than the world's farmers grow today. For this purpose, modern biotechnology must become an integral supplement to conventional breeding programs (Jauhar 2006). Obtaining viable transgenic cereal plants usable in agriculture is part of the biotechnological effort to ensure food security.

The establishment of useful genetic transformation systems for cereals is of foremost importance for the introduction of traits such as enhanced food value, valorization of short water availability, and increased resistance to disease. Contemporary methods of genetic transformation of cereals, which include the use of attenuated Agrobacterium (*Agrobacterium tumefaciens*) strains, represent a naturally evolved and artificially optimized vehicle to integrate recombinant DNA into the nuclear genome of plants. Other useful transformation methods include direct gene transfer, through the bombardment of target cells with accelerated DNA-coated metal particles.

Agrobacterium-mediated gene transfer into monocotyledonous plants was not possible until recently, since these plants are not among the typical natural hosts of this soil-borne bacterium. Direct DNA-transfer was the preferred principle in most of the early attempts to generate transgenic cereals. In 1994, the pioneering work of Hiei et al. (1994) provided evidence that rice could be efficiently transformed with Agrobacterium, and genetic analysis showed the stability of the transformation on R0, R1 and R2 progeny. This finding represented a breakthrough in cereal biotechnology, opening up the possibility of using

For Peer Review

Agrobacterium for the transformation of major cereal crops such as maize, barley and wheat. (For a review, see Shrawat and Lörz 2006; Goedeke et al. 2007).

Today, the transgenic characteristics of cereals have been reported after transformation through two methods: direct delivery-mediation and Agrobacterium mediation. Both methods can be used to produce transgenic plants with important agronomic traits. Studies on cereal transformation revealed that delivery mediated by particle bombardment facilitated a broad variety of transformation strategies with a wide range of gene expression, and had no biological constraints or host limitations. Various cell types could be targeted efficiently for foreign DNA delivery (Altpeter et al. 2005). Nevertheless, Agrobacterium mediated transformation remains a method of choice for obtaining transgenic plants with a lower copy number, intact foreign genes and stable gene expression.

Indeed, production of good quality transgenic plants requires a stable inheritance; the expression of foreign genes without collateral effects requires the circumvention of various obstacles which normally would lead to the abolishment of gene transcription. Gene silencing or the progressive loss of gene expression in the subsequent generation can occur, and are currently associated with a high number of transgene copies integrated in the host genome (Matzke et al. 2000). However, Chareonpornwattana et al. (1999) argue that silencing could be more related to strong promoter-inducing high gene expression level than to gene copy numbers. Silencing can be overcome by the integration of the transgene in a pre-determined genomic locus (Day et al. 2000; Ow 2002). Equally, the use of matrix attachment regions placed on each side of the transgene cassette confers resistancy to gene silencing (Cockerill and Gerard 1986; Allen et al. 2000). Integration of the backbone sequence from the vector seems to be another factor affecting the transgene stability and expression, whatever the transformation method used. More work remains to be done in order to understand the process

For Peer Review

of integration of transgenes, before this technology can become a conventional method in plant breeding.

At this state of advancement in cereal transformation, it seems that Agrobacterium-mediated transformation systems not only promise to intensify attention on the production of cereals with genes of interest, but also to concurrently test and capture the value of the introduced traits (Shrawat and Lörz 2006). Nevertheless, this transformation method is still cumbersome and time-consuming. The general scheme for Agrobacterium-mediated transformation of cereals plants requires various steps including explants from immature embryos, co-cultivation with the bacteria, selection, regeneration, rooting and transfer to soil. Certain components are necessary for transformation efficiency, such as sugar, plant growth factor, antinecrotic mixture for controlling oxidative burst, vir-induction chemicals, and antibiotics to suppress or eliminate Agrobacterium following co-culture (for review see Opabode 2006). At least 13 weeks are necessary from the first explants step to the final planting of a transgenic plantlet in soil.

We describe here an easy and efficient alternative method for obtaining transformed cereal plants based on Agrobacterium-mediated gene transfer, which avoids cell culture and plant regeneration. This is achieved by the incubation of germinating cereal plantlets in a culture of Agrobacterium cells. With this method, we save time, chemicals and media, and the results are similar to those obtained from the classical method.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Seeds from Wheat (*Triticum aestivum*, cv Soisson), Maize (*Zea mays*), and Sorghum (*Sorghum bicolor*, cv Targga) were sterilised by soaking in a 10% sodium hypochlorite for

For Peer Review

20 min, washed with sterilised water. They were then incubated in HCl 10 mM solution for 5 min, followed by several washes with sterile distilled water, then germinated on sterile moistened Wattman paper in Petri dish in a chamber at 21 ± 2°C (light/dark).

Isolation of promoter DNA

Sequence promoter of the high molecular weight glutenin subunit (TaHMW) from wheat (cv Soissons) was isolated from genomic DNA by PCR walking adapted from the protocol describing by Devic et al. (1997). Adaptor primers were AP1 5'-GGATCC TAATACGACTCACTATAGGGC-3'; and AP2: 5'-CTATAGGGCTCGAG CGGC -3'. For nested PCR reactions, *pfu* polymerase (Promega) was used in combination with the specific primers Y1 5'-GATGACTACTGCCGCAAAGAGGAC-3' and Y2 5'-AAAGAGGACCA GCCGCTTAGCCAT-3'.

The primary PCR parameters were one cycle at 95°C fir 3 min, then 30 cycles at 95°C for 1 min, 67°C for 30 sec, 72°C for 1 min, and finally one cycle at 72°C for 7min and the primers used were AP1 and Y1. For the second PCR, the program was one cycle at 95°C fir 3 min, then 30 cycles at 95°C for 1 min, 61°C for 30 sec, 72°C for 1 min, and finally one cycle at 72°C for 7min and *pfu* polymerase and the primers used were AP2 and Y2. The fragments obtained were subcloned into the plasmid pGEM-T vector (Promega) for sequencing. Putative cis-regulatory sequences were analyse with bioinformatics approaches identifying transcription factor binding sites or cis-acting sequences in plant promoter using PlantPAN database (http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/index.php, Chang et al. 2008), a system collecting the plant transcription factor binding profiles from PLACE (Higo et al. 1999), TRANSFAC (public release 7.0, Wingender et al. 2000), AGRIS (Davuluri et al. 2003), and JASPER (Sandelin et al. 2004) databases.

For Peer Review

GUS reporter gene construction and plant transformation

A 917 pb fragment ending in the ATG codon was amplified by PCR with primers Y3 5'-ATAAAGCTTTGGAGATCATAGAAGAACATAAGAG-3' and Y4 5'- TATGGATCCCATCTCAGTGAACTGTCAGTGA-3' bearing Hind III and Bamh I restriction sites respectively, and cloned into the pBI101 vector (Clontech) at the initiation codon of the promoterless GUS gene generating the pTaHMWy vector.

The plasmid pPsTrxh1::GUS bearing a pea (*Pisum sativum*) thioredoxin h promoter driving the GUS gene into the pBI101 (Traverso et al. 2007) vector and the pTaHMWy vector were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* (C58pMP90).

Arabidopsis plants (*Arabidopsis thaliana*; ecotype Columbia) were transformed via Agrobacterium by the floral dip method (Clough and Bent 1998). T1 and T2 seedlings were selected *in vitro* on Murashige and Skoog medium supplemented with 1% (w/v) Sucrose, 0.8% (w/v) agar, and 30 mg/mL kanamycin under a 16-h-light/8-h-dark regime at 22°C.

For cereal transformation, a procedure was adapted from Clough and Bent (1998). Seeds were allowed to germinate in the dark under controlled, sterile conditions on filter paper soaked with water in Petri dishes. Freshly isolated seedlings were immersed in Agrobacterium suspension for 15 min so that the entire root and shoot systems interact with the Agrobacterium culture, and submit to vacuum to enhance infiltration. Plantlets were washed to remove excess of bacterial solution and transferred on filter paper soaked with water in Petri dishes or into sterilised soil and maintained in a growth chamber at 21 ±2°C under a 14/10 h (light/dark).

Analysis of transgenic plants

For Peer Review

Screening of transgenic lines was carrying out by PCR method using a couple of primers created to amplify 491 bp from the GUS gene (5'-GAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCG-3'; 5'-GTCGCGCAAGACTGTAACCAC-3').

Total genomic DNA was isolated from plant leaves using the DNeasy plant Mini Kit (Qiagen).) PCR parameters were one cycle at 95°C for 3 min, then 30 cycles at 95°C for 1 min, 61°C for 30 sec, 72°C for 30 sec; and finally one cycle at 72°C for 7min.

Transgene copy number was determined by real-time PCR using an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems Co.; Foster City, USA). For this purpose, specific primers pair (5'- GGCAGGCCAGCGTATCG-3'; 5'-TTGACCCACACTTTGCCGTA-3') and a fluorescent labelled TaqMan probe (5'-FAM-CTGCGTTTCGATGCGGTCACTCA -TAMRA-3') were used to amplify and detect 64bp fragment from the gene GUS. Plasmid pPsTrxh1::GUS was used to carry out a calibration curve. DNA concentration was determined by spectrometry (Jenway 6405) at 260 nm and its corresponding concentration was converted into copies per microlitre by using the Avogadro constant ($6.023x10^{23}$) and its molecular weight which is the number of bases of a PCR product multiplied by the average molecular weight of a pair of nucleic acids, which is 660 Da (Sambrook et al. 1989). A calibration curve was generated by plotting the threshold cycle (Ct) values of different standard dilutions against the amount log number of standard expressed as copies per microliter. Comparison of Ct value of unknown target amounts with the standard curve allows the calculation of the initial target amount used in real-time PCR procedure.

For each reaction, 2.5µl of DNA, 12.5 µl 2xTaqMan Universal Master mix (Eurogentec), 0.75 µM of each primer and 100 nM of the dual labelled probe were added, and reactions were brought to a final volume of 25 µl. PCR conditions were the followings: 2 min at 50°C; 10

For Peer Review

min at 95°C; 40 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C. Ct value was determined by using the instrument's software and adjusted manually as necessary.

GUS histochemical staining was performed using 5-brom-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide as described by Jefferson et al. (1987). Tissues were then distained with 70% ethanol at 37°C to remove green background. Tissues were observed with Zeiss Axiophot microscope and Leica MZFL III binocular. Images were captured with a Leica DC 200 video camera.

For Peer Review

Results

Analysis of TaHMWy promoter and test in Arabidopsis plant

Promoter analysis is an essential step on the way to identifying regulatory networks. We used the PCR-walking technique to isolate from a wheat (*Triticum aestivum* , cv Soissons) genomic DNA library, a fragment corresponding to a TaHMWy promoter sequence, and also corresponding to a 914 pb fragment upstream from the translation start site which is at + 61 (taking the transcription site as position 1). The sequence has been deposited in the NCBI database, accession number FJ561336. It mainly overlaps with the AJ301618 sequence (Lamarchia et al. 2001), though with some gaps, particularly at 53pb (-418 to -366), which does not belong to the cited sequence. Bioinformatics analysis based on transcription-factor binding sites was undertaken with PlantPAN libraries. Analysis highlights a tandem repeat (Fig.1) of 108pb (-449 to -341) organized in two perfect adjacent copies of a 54bp repeat seed (CACTACTCGACATGGTTAGAAGTTTTGAGTGCCGCATATTTGCGGAAGCAATGG). The 53bp sequence which is missing in AJ301618 overlaps respectively with the end and the beginning of the two adjacent seeds.

Among the many cis-elements retrieved, we find a common CCAAT box (-582; -173) generally found in the 5'-non-coding regions of eukaryotic genes; a plant TATA box (-30); a CGCG box (-727) present in the promoters of many genes. Analysis also retrieved two GCN4 motives (-587; - 569) found in the GluB-1 gene in rice. Numerous boxes belonging to the related Dof (DNA binding with one finger) factors are found such as Dof1, Dof2, Dof3, PBF (prolamin-box binding factor) and Dofcorezm. There are other remarkable elements known as light-dependant motifs such as GATA boxes, consensus GT1 binding sites and one Ibox. Taken together, the DNA fragment isolated from the wheat genome (cv Soissons) exhibits a level of complexity that allows it to constitute a putative functional promoter unit. Certain regulatory motives found, such as the prolamin boxes, could be sufficient to drive gene expression in seed.

To examine the efficiency of the TaHMW promoter in regulating gene expression, the 5' flanking sequence was fused to the *uid*A (GUS) reporter gene via the pBI101 vector, and named pTaHMW::GUS (Fig.1). It was then used to transform Arabidopsis plantlets. Histochemical and fluorogenic assays detected GUS expression in the inflorescence in stable transformed plants. In mid-mature inflorescence of T1 progeny (Fig. 2A), the staining ranged from a strong blue color in the remaining stigma and the rachis nodes to a weak blue in the endocarp of the silique. In an unpollinated senescing pistil, (Fig. 2B), a longitudinal section showed the staining in the valves tissues. In a close-up of the boxed area (Fig.2C), the staining appeared in the funiculus and in the chalaza. This pattern of GUS activity was not detected in the control plant transformed with an empty PBI101 vector. These results corroborate the functionality of the pTaHMW::GUS construct.

For Peer Review

Production of transgenic cereals

The aptitude of cereal seeds for direct transformation was analyzed from the stage of imbibition to that of the developed seedling. Seeds maintained at 4° C were surface sterilized and allowed to germinate under controlled, sterile conditions on filter paper soaked with water. *Triticum aestivum* cv Soissons, which is responsive to vernalization for flowering, is allowed to germinate at 4°C in the dark. For the transformation procedure, seedlings at different stages of germination were simply immersed in the same buffer used to transform Arabidopsis by floral dip. Various times of incubation were analyzed between 10 and 45 min., in two cases: under vacuum infiltration, and without it.

We included Silwet L-77 (LEHLE SEEDS), a strong surfactant that shows relatively low toxicity to plants, and often enhances transformation reliability. Plant material was then rinsed with sterile water to eliminate any excess of transformation buffer, and then transplanted in commercial sterile compost or on soaked paper for further growth under controlled conditions.

Two weeks after transformation, PCR analysis was performed to screen the different primary plants (T0) grown in commercial sterile compost. A specific 491bp band corresponding to a GUS sequence was amplified, confirming the integration of the reporter cassette into the recipient genome (Fig. 3). For the seeds allowed to germinate on soaked paper, with a primary root of 1-2 cm and greening coleoptiles, data show that an incubation of 15min. in the cell culture containing surfactant L77 under vacuum infiltration is sufficient for an effective transformation of the cultivars used.

GUS activity assays in transgenic tissues

48 h. after transformation with pPsTrxh1:: GUS cassette, a weak GUS activity was detected in the sorghum shoot seedlings, mainly localized in the apex and downward (Fig. 4A). With maize seedlings, the staining is localized on the coleoptiles (Fig. 4B), while it appears more

For Peer Review

homogeneously in the coleoptile and radicula and side roots in wheat seedlings (Fig. 4C). In mature plants, as was observed with Arabidospsis, GUS activity was especially detected in vascular tissues of maize and wheat leaves (Fig 5). A close-up view shows the micro-patches of blue on the vascular tissues in maize and wheat respectively (Fig. 5C and 5F). Seeds from T0 transgenic plants exhibited various gene reporter expression patterns during germination, according to the plant species. Figure 6 shows a GUS activity in the scutellum and the coleoptile in a germinating wheat seed. In this case, no expression was observed in the endosperm or in radicula. GUS staining was generally hard to observe in mature sorghum tissues, or was detected mainly in tissues in active growth, such as nodes. Pea (*Pisum sativum*, cv Hardy) seedling consequently transformed with the same cassette according to our procedure gives results similar to wheat and maize (result not shown). On this basis, dicotyledonous could be effectively transformed by this method.

Transformed with pTaHMW::GUS construct, GUS staining was first observed, as with Arabidopsis, in young inflorescence of T0 plants. GUS activity was more visible in florets before anthesis (Fig. 7B). It was equally observed in the whole immature seed (Fig. 7C). Young seeds cut longitudinally exhibit patches of blue of different intensities (Fig.7D). Analysis of transformed plants by PCR techniques showed that sorghum exhibits the greatest aptitude to be transformed by this method with a frequency of 30%, while wheat and maize have a frequency of 15% and 10% respectively. To check the effect of the transformation procedure on the transgene integration frequency in the host plant genome, the number of copies integrated was determined by real-time quantitative PCR, using pPsTrxh::GUS plasmid to draw a standard curve. A relatively low number of copies (Table 1) are found which is consistent with Agrobacterium characteristics.

For Peer Review

Discussion

The use of transgenic technologies for the genetic manipulation of plant species has a great impact on biotechnology. Two important components are required for the expression of foreign genes in plant cells: a plasmid carrying an expression cassette and a method to deliver it into the plant cell. Agrobacterium-mediated gene transfer into monocotyledonous plants presents the advantage of singular integration patterns, entailing lower mutational consequences for the transgenic plant and limited transgene silencing. In spite of improvements to render cereal species amenable to genetic engineering, transformation protocols remain tedious.

To develop this protocol, we used two types of promoters. The first one was of the dicotyledonous type, isolated from pea genome (Traverso et al. 2007) and expressed in vascular tissues and inflorescence; it was used as the control. The second promoter was of the monocotyledonous type, isolated from wheat genome, and normally controlled the expression of glutenic subunits protein in the endosperm. Analysis of the sequence isolated by DNA walking revealed the presence of the typical cis-elements to be expected in a plant promoter. A 54bp perfect tandem repeat sequence was found within the promoter. Previous studies reveal that repeats found within a promoter may be involved in up-regulation of gene expression (Tatematsu et al. 2005). Among the elements retrieved, we can underline the presence of light-dependant motifs such as GATA, GT1 and I-box. GATA DNA motifs were first implicated in light-dependant gene regulation in plants. I-box and other GATA-related motifs have been found in many light-regulated genes (Lam and Chua 1989; Gilmartin et al. 1990; Terzagni and Cashmore 1995; Villain et al. 1996). Subsequent studies implicated these elements in the regulation of circadian-responsive genes (Carré and Kay 1995; Teakle and Kay 1995) and the regulation of nitrogen metabolism (Fu and Marzluf 1990; Kudla et al.

For Peer Review

1990; Daniel-Vedele and Caboche 1993; Scazzocchio 2000; Bi et al. 2005). However, recent studies connected GATA factors to a wide range of different biological functions (Manfield et al. 2007).

Genes specifically expressed during cereal endosperm development contain common cis-motifs in their promoters. These are the GCN4-like motifs. This cis-element is highly conserved in the promoter of cereal seed storage protein genes, controlling endosperm-specific expression (Müller and Knudsen 1993). Another typical element is the prolamin box. Numerous motifs belonging to the related Dof (DNA binding with one finger) factors were found, a class of plant-specific transcription factors containing the highly conserved zinc finger DNA-binding domain (Yanagisawa and Schmidt 1999; Yanagisawa 2000; Marzábal et al. 2008). A Dof transcription factor isolated from wheat endosperm suggested functioning as an activator of prolamin gene expression during seed development. But recent studies show that this Dof protein functions, not only during wheat seed development, but also during other growth and development processes (Dong et al. 2007). However, GUS staining indicates the pTaHMW promoter can drive gene activity in seeds, including in wheat endosperm. Nevertheless, the reporter gene is not expressed in an endosperm-specific manner, since it was found in young inflorescence. In spite of the complexity of the pTaHMWy promoter, it may not contain the adequate combination of cis-elements needed to drive strict tissue-specific gene expression.

Seeds are the traditional manner to store cereals and most other plant species, in order to preserve their capacity to germinate. The objective of this study was to develop a rapid method of transformation of cereals starting from seed, thus avoiding the stages requiring in vitro tissue culture and plant regeneration. For this, we worked on three economically important species: wheat, maize and sorghum. The transformation events reported in this

For Peer Review

work produced fully fertile plants expressing the reporter gene and transmitting it to T1 progeny, where it was also expressed. Furthermore, the transformation efficiency is similar to what is generally found with other methods for wheat and maize, and even better for sorghum (Sahrawat and Lorz 2006; Nguyen et al. 2008).

Transformation frequency observed by the direct method showed that it was relatively easy to transform the cereals varieties used. Surfactants may enhance T-DNA delivery by aiding Agrobacterium attachment and or by elimination of certain substances that inhibit bacteria attachment (Opabode 2006). In effect, the surfactant Silwet L77 used, as in floral-dip methods with Arabidopsis, had a positive effect on the method's efficiency. These results constitute a good argument for the method, because to achieve transgenic lines remains in itself a challenging task, due to the low transformation frequency (Cheng et al. 2004). Furthermore, when the number of copies of a transgene in a plant chromosome is small, the incidence of instability is much lower (Jones 2005).

Generally, we observed that the GUS activity was more intense when the plant contains the cassette pTaHMW:: GUS than when it contains the pPsTrxh:: Gus. This is probably due to the fact that promoters from dicotyledonous plant species, in spite of having a wide range of specificities and expression strengths, do not often work appropriately in the genetic context of monocotyledons (Goedeke et al. 2007). Some plants with the integrated reporter gene were responding negatively to the staining, probably either from gene inactivation (Fagard and Vaucheret 2000) or from truncated transfers (Wang et al. 1984). Recently, Veena et al. (2003) showed that Agrobacterium infection induces a differential of gene expression during the early stages of infection. In this respect, in spite of being the easiest plant to transform by this procedure, Sorghum exhibits the lower GUS expression. Carvalho et al. (2004) reported that GUS expression was not a reliable parameter for assessing sorghum transformation. On the

For Peer Review

other hand, Emani et al. (2002) could reactivate the expression of GUS in transgenic sorghum lines using azacytidine, a chemical causing hypomethylation of DNA. These data suggest that methylation-based silencing occurs in sorghum with a higher frequency than in wheat or in maize. In addition to the ease of transformation, the present method allows us to avoid the well-known black pigment production from isolated immature sorghum embryos, which contribute to sorghum recalcitrance for in vitro response (Hagio 2002; Jeoung et al. 2004; Gao et al. 2005, Nguyen et al. 2008).

In summary, the technology for genetic engineering of plants has an important impact on basic research and biotechnology. The transformation procedure for plant models, such as Arabidopsis, is under control today. Achieving easy and effective methods of transformation for important plant crops, which are often the most recalcitrant species, is necessary for their study and their improvement. In this context, the techniques of transformation of cereals constitute a very active research field, to develop versatile binary vectors and new explants, or to take advantage of specific regulating elements found in promoters driving gene expression in seed tissues. In this paper, we developed a procedure allowing the direct transformation of cereals by *Agrobacterium tumefaciens*. This method avoids the tissue culture and plant regeneration steps, constituting time savings of at least ten weeks, compared with the requirements of the standard method. Furthermore, it saves reagents and handling. The method is easy and effective for the expression of GUS gene in maize, sorghum and wheat, as well as in pea which is dicotyledonous. This method of transformation is potentially applicable to any plants species carrying orthodox seeds.

For Peer Review

Acknowledgments

This work was supported by a grant DAER-Recherche/03012020 from Region Midi-Pyrénées and fellowship DGER-EIP 01D235F.

The authors are grateful to Dr Tom Timmer, Dr Marie-Christine Auriac and Stéphanie Encinas for their kind suggestions and technical assistance.

References

Allen GC, Spiker S and Thompson WF (2000) Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. Plant Mol Biol 43: 361–376. DOI 10.1023/A:1006424621037

Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock, R, Capell T, Christou P, Daniell H, Datta K, Datta S, Dix PJ, Fauquet C, Huang N, Kohli A, Mooribroek H, Nicholson L, Nguyen TH, Nugent G, Raemakers K, Romano A, Somers DA, Stoger E, Taylor N, Visser R (2005) Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. Mol Breed 15: 305– 327. DOI 10.1007/s11032-004-8001-y

Bi YM, Zhang Y, Signorelli T, Zhao R, Zhu T, Rothstein S (2005) Genetic analysis of Arabidopsis GATA transcription factor gene family reveals a nitrate-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity. Plant J 44: 680–692. DOI 10.1111/j.1365-313X.2005.02568.x

Borlaug NE (1998) Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. Plant Tiss Cult Biotech 3: 119–127.

For Peer Review

Borlaug NE (2004) Feeding a World of 10 Billion People: Our 21st Century Challenge. (p 31-56) In: Colin G. Scanes, CG, John A. Miranowski JA (eds) Perspectives in World Food and Agriculture. Iowa State Press, pp 31-56. DOI 10.1002/9780470290187

Carré IA, Kay SA (1995) Multiple DNA-protein complexes at a circadian regulated promoter element. Plant Cell 7: 2039–2051. DOI 10.1105/tpc.7.12.2039

Carvalho CHS, Zehr UB, Gunaratna N, Anderson J, Kononowicz HH, Hodges TK, Axtell JD (2004) Agrobacterium- mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. Genet Mol Biol 27:259–269

Chang W-C, Lee T-Y, Huang H-D, Huang H-Y, Pan R-L (2008) PlantPAN: Plant Promoter Analysis Navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. BMC Genomics 9: 561 DOI 10.1186/1471-2164-9-561

Chareonpornwattana S, Thara KV, Wang L, Datta SK, Panbangred W, Muthukrishnan S (1999) Inheritance, expression, and silencing of a chitinase transgene in rice. Theor Appl Genet 98: 371–378. DOI 10.1007/s001220051082

Cheng M, Lowe BA, Spencer TM, Ye X, Armstrong CL (2004) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 40: 31-45. DOI 10.1079/IVP2003501.

For Peer Review

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium- mediated transformation of A. thaliana. Plant J 16: 735–743 DOI 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x

Cockerill PN, Gerrard WT (1986) Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. Cell 44: 273–282. DOI 10.1016/0092-8674(86)90761-0

Daniel-Vedele F, Caboche M (1993) A tobacco cDNA clone encoding a GATA-1 zinc finger protein homologous to regulators of nitrogen metabolism in fungi. Mol Gen Genet 240: 365–373. DOI 10.1007/BF00280388

Davuluri RV, Sun H, Palaniswamy SK, Matthews N, Molina C, Kurtz M, Grotewold E: AGRIS (2003) Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. BMC Bioinformatics 4:25. DOI 10.1186/1471-2105-4-25

Day CD, Lee E, Kobayashi J, Holappa LD, Albert H, Ow DW (2000) Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, oralleles that are differentially silenced. Genes Dev. 14: 2869–2880. DOI 10.1101/gad.849600

Devic M, Albert S, Delseny M, Roscoe TJ (1997) Efficient PCR walking on plant genomic DNA. Plant Physiol Biochem 35: 331-339.

For Peer Review

Dong G, Ni Z, Yao Y, Nie X, Sun Q (2007) Wheat Dof transcription factor WPBF interacts with *TaQM* and activates transcription of an alpha-gliadin gene during wheat seed development. Plant Mol Biol 63: 73-84. DOI 10.1007/s11103-006-9073-3

Emani C, Sunilkumar G, Rathore KS (2002) Transgene silencing and reactivation in sorghum. Plant Sci 162:181–192

Fagard M, Vaucheret H (2000) (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms ? Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 51: 167-194; DOI 10.1146/annurev.arplant.51.1.167

Fu YH, Marzluf GA (1990) Site-directed mutagenesis of the zinc finger DNA-binding domain of the nitrogen-regulatory protein Nit2 of Neurospora. Mol Microbiol 4: 1847–1852

Gao Z, Xie X, Ling Y, Muthukrishnan S, Liang GH (2005) Agrobacterium tumefaciens-mediated sorghum transformation using a mannose selection system. Plant Biotech J 3:591–599. DOI 10.1111/j.1467-7652.2005.00150.x

Gilmartin PM, Sarokin L, Memelink J, Chua NH (1990) Molecular light switches for plant genes. Plant Cell 2: 369–378

Goedeke S, Hensel G, Kapusi E, Gahrtz M, J Kumlehn J (2007) Transgenic Barley in fundamental research and biotechnology. Trans Plant J 1(1):104-117.

Hagio T (2002) Adventitious shoot regeneration from immature embryos of sorghum. Plant Cell Tiss Org Cult 68:65–72. DOI 10.1023/A:1012918316140

For Peer Review

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J 6: 271-282. DOI 10.1046/j.1365-313X.1994.6020271.x

Higo K, Ugawa, Y, Iwamoto M and Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. Nucleic Acids Res 27: 297-300.

Jauhar, PP (2006) Modern Biotechnology as an Integral Supplement to Conventional Plant Breeding: The Prospects and Challenges. Crop Sci 46:1841–1859. DOI:10.2135/cropsci2005.07-0223

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6: 3901-3907.

Jeoung JM, Krishnaveni S, Jayaraj J, Haying Y, Trick HN, Muthukrishna S, Liang GH (2004) Agrobacterium-mediated transformation of grain sorghum. In: Seetharama N, Godwin I (eds) Sorghum tissue culture and transformation. Science Publishers, pp 57–64

Jones HD (2005) Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. J Cereal Sci 41(2): 137-147. DOI 10.1016/j.jcs.2004.08.009

Kudla B, Caddick MX, Langdon T, Martinez-Rossi NM, Bennett CF, Sibley S, Davies RW, Arst HN (1990) The regulatory gene Are A mediating nitrogen metabolite repression

For Peer Review

in Aspergillus nidulans— mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. EMBO J 9: 1355–1364

Lam E, Chua NH (1989) ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. Plant Cell 1: 1147–1156

Lamacchia C, Shewry PR, Di Fonzo N, Forsyth JL, Harris N, Lazzeri PA, Napier JA, Halford NG, Barcelo P (2001) Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. J Exp Bot 52: 243-250

Manfield IW, Devlin, PF, Jen CH, Westhead DR Gilmartin PM (2007) Conservation, Convergence, and Divergence of Light-Responsive, Circadian-Regulated, and Tissue-Specific Expression Patterns during Evolution of the Arabidopsis GATA Gene Family. Plant Physiol 143:941-958. DOI /10.1104/pp.106.090761

Marzábal P, Gas E, Fontanet P, Vicente-Carbajosa J, Torrent M, Ludevid MD (2008) The maize Dof protein PBF activates transcription of γ-zein during maize seed development. Plant Mol Biol 67: 441-454. DOI 10.1007/s11103-008-9325-5

Matzke MA, Mette MF, Matzke AJM (2000) Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. Plant Mol Biol 43: 401–415. DOI 10.1023/A:1006484806925

Müller, M and Knudsen, S. (1993) The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box. Plant J 4:343–355. DOI 10.1046/j.1365-313X.1993.04020343.x

For Peer Review

Nguyen T-V, Thu TT, Claeys M, Angenon G (2007) Agrobacterium-mediated transformation of sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench) using an improved in vitro regeneration system. Plant Cell Tiss Organ Cult 91:155–164. DOI 10.1007/s11240-007-9228-1

Ow DW (2002) Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. Plant Mol Biol 48:183–200. DOI 10.1023/A:1013718106742

Opabode JT (2006) Agrobacterium-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. Biotech Mol Biol Rev 1 (1):12-20.

Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989) Concenntration of DNA solution. In *Molecular cloning: A Laboratory Manual* ed. Nolan, C. pp. C1 New York: Cold Spring Harbour Laboratoty Press.

Sandelin A, Alkema W, Engstrom P, Wasserman WW, Lenhard B (2004) JASPAR an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. Nucleic Acids Res 32(Database issue):D91-94.

Scazzocchio C (2000) The fungal GATA factors. Curr Opin Microbiol 3: 126–131 DOI 10.1016/S1369-5274(00)00063-1

Shrawat AK, Lorz H (2006) Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. Plant Biotechnol J 4:575–603. DOI 10.1111/j.1467-7652.2006.00209.x

For Peer Review

Tatematsu K, Ward S, Leyser O, Kamiya Y, Nambara E (2005) Identification of cis-Elements That Regulate Gene Expression during Initiation of Axillary Bud Outgrowth in Arabidopsi. Plant Physiol 138:757–766 DOI 10.1104/pp.104.057984.

Teakle GR, Kay SA (1995) The GATA-binding protein CGF-1 is closely related to GT-1. Plant Mol Biol 29: 1253–1266. DOI 10.1007/BF00020466

Terzagni WB, Cashmore AR (1995) Light-regulated transcription. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:445-474. DOI 1146/annurev.pp.46.060195.002305

Traverso JA, Vignols F, Cazalis R, Pulido A, Sahrawy M, Cejudo FJ, Meyer Y, Chueca A. 2007. PsTRXh1 and PsTRXh2 are both pea h-type thioredoxins with antagonistic behavior in redox imbalances. Plant Physiol 143, 300–311. DOI 10.1104/pp.106.089524

Veena, Jiang H, Doerge RW, Gelvin SB (2003) Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. Plant J 35: 219–236. DOI 10.1046/j.1365-313X.2003.01796.x

Villain P, Mache R, Zhou DX (1996) The mechanism of GT element-mediated cell –specific transcriptional control. J Biol Chem 271:32593-32598.

Wang K, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Zambryski, P (1984) Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from agrobacterium to the plant genome, Cell 38:455−462. DOI 10.1016/0092-8674(84)90500-2

For Peer Review

Wingender E, Chen X, Hehl R, Karas H, Liebich I, Matys V, Meinhardt T, Pruss M, Reuter I, Schacherer F (2000) TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. Nucleic Acids Res 28:316-319.

Yanagisawa S, Schmidt RJ (1999) Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. Plant J 17: 209-214. DOI 10.1046/j.1365-313X.1999.00363.x

Yanagisawa S (2000) Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. Plant J 21:281-288. DOI 10.1046/j.1365-313x.2000.00685.x

Table

Genomic DNA	Copy number in transgenic plants
Wheat	0.7
Maize	3.5
Soghum	1.16

Table 1

GUS copy number estimated from real-time PCR.

For Peer Review

Number of transgene copy determined by real-time PCR. pPsTrxh::GUS plasmide was used to carry out a calibration curve; this was generated by plotting the threshold cycle (Ct) values of different standard dilutions against the log number of amount of standard expressed as copies per microliter. Comparing the Ct of unknown amounts of target with the standard curve allows the calculation of the initial amount of target used in real-time PCR.

Figure legends

Figure 1

A. Schematic representation of the promoter region of the TaHMW gene from wheat (*Triticum aestivum*, cv Soissons) used in transgenic cereals seedlings. Location of some of the putative *cis*-acting motifs predicted by PlantPAN database is shown by boxes.

Figure 2

Anatomical expression patterns of Arabidopsis transformed with the wheat TaHMW promoter driven the GUS reporter gene. A. Staining in mid mature inflorescence of T1 progeny is localized in the remaining stigma, rachis nodes and endocarp of the silique. B. GUS staining in a longitudinal section of unpollinated senescing pistil localized in the valves tissues and the funiculus. C. Close-up of the boxed area showing transient GUS expression in the funiculus and in the chalaza.

Figure 3

PCR analysis of genomic DNA of T0 progeny by the use of specific primers of GUS gene to amplify a specific 491bp amplicon. T0 transformants were obtained from seedling infected

For Peer Review

with Agrobacterium tumefaciens strain C58pMP90 (pBI101-pPsTrxh or pTaHMW). Plasmid pPsTrxh::GUS or pTaHMW::GUS and genomic DNA from plant transformed with empty cassette were used as positive and negative control respectively. A. Analysis on 1% agarose gels of different lines of transgenic wheat (*Triticum aestivum* cv Soissons); negative control (1), wheat transformants (2-5), positive control (6), molecular size markers (M). B. Different transgenic plants: Arabidopsis (1); Sorghum (2); Maize (3); Wheat (4), positive control (5); size marker (M).

Figure 4

Transient GUS gene expression in sorghum, maize and wheat seedlings containing the pPsTrxh::GUS cassette 48h after transformation. Tissues were then distained with 70% ethanol at 37°C to remove green background. A. GUS staining is localized in the sorghum shoot apex and downward (a); negative control (b). B. Staining is localized on the coleoptiles in maize seedlings (a); negative control (b). C. Staining localized homogeneously in the coleoptile and radicula and side roots in wheat seedlings (a); negative control.

Figure 5

Histochemical localization of GUS activity in transgenic lines of maize (A, B, C) and wheat (D, E, F) plants expressing the *UidA* reporter gene under the control of PsTrxh promoter. After staining, leaves fragments were then distained with 70% ethanol at 37°C to remove green background. GUS staining was detected in vascular tissues from the green organs such as leaves (B, E). Close-up view showing distribution of micro patches of blue on the vascular tissues in maize and wheat leaves respectively (C, F); negative control (A, D).

For Peer Review

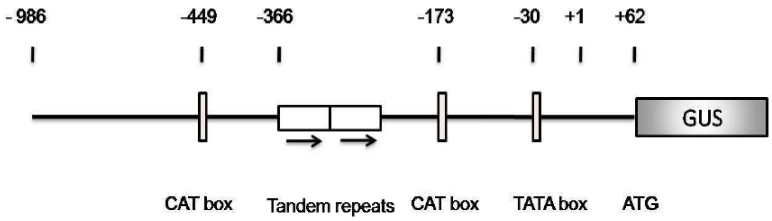
Figure 6

GUS gene expression in T1 wheat seedling expressing the pPsTrxh::GUS cassette. Seeds were allowed to germinate in the dark under controlled, sterile conditions on filter paper soaked with water in Petri dishes. Staining is localized in the scutellum and the coleoptile in a germinating seed 48h after imbibition.

Figure 7

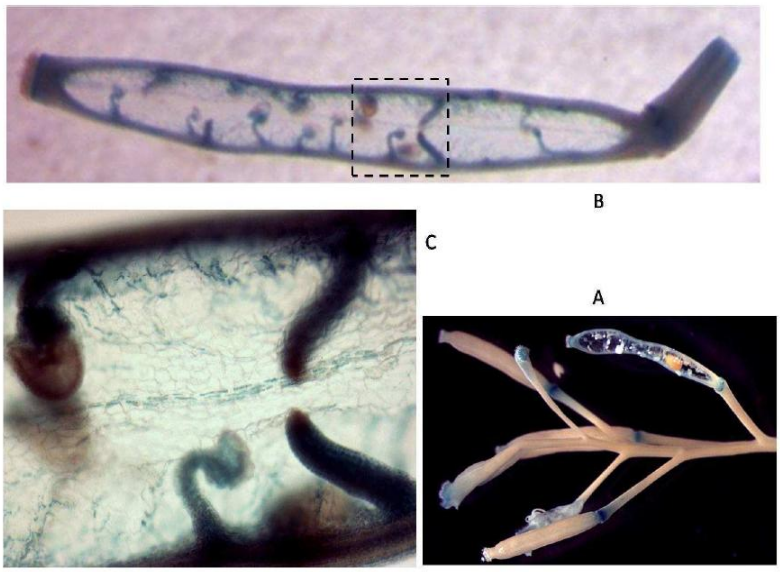
Transient GUS gene expression in wheat seed from T0 plants expressing the pTaHMW::GUS cassette. A. Negative control. B. GUS activity was visible in florets from young inflorescence. C. GUS Expression observed in the whole immature seed 10 days after anthesis. D. Split seed showing a distribution of blue colour patches in the endosperm in an immature seed (10 days after anthesis).

For Peer Review



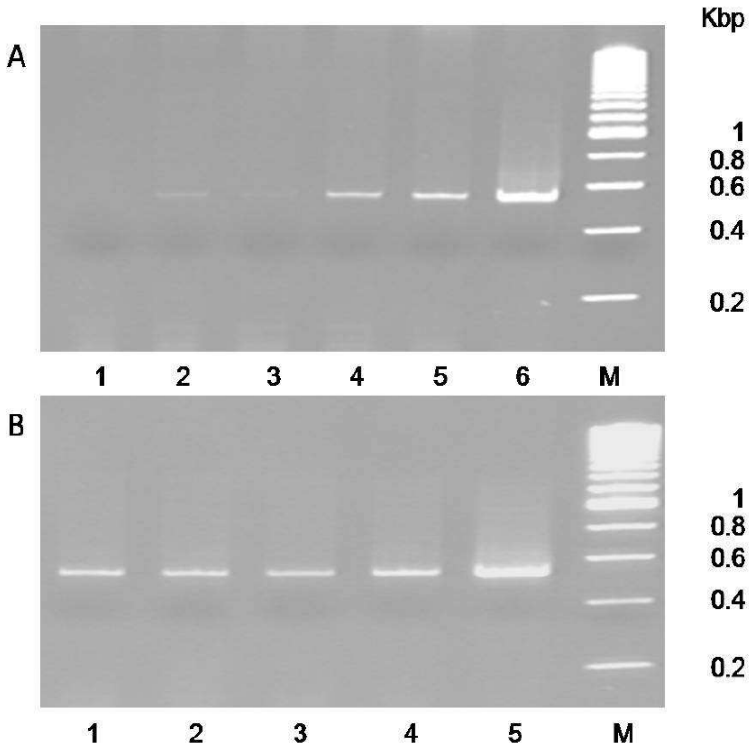
Schematic representation of the promoter region of the TaHMW gene from wheat (Triticum aestivum, cv Soissons) used in transgenic cereals seedlings. Location of some of the putative cis-acting motifs predicted by PlantPAN database is shown by boxes
212x56mm (150 x 150 DPI)

For Peer Review



A. Staining in mid mature inflorescence of T1 progeny is localized in the remaining stigma, rachis nodes and endocarp of the silique. B. GUS staining in a longitudinal section of unpollinated senescing pistil localized in the valves tissues and the funiculus. C. Close-up of the boxed area showing transient GUS expression in the funiculus and in the chalaza.
241x162mm (150 x 150 DPI)

eview



PCR analysis of genomic DNA of T0 progeny by the use of specific primers of GUS gene to amplify a specific 491bp amplicon. T0 transformants were obtained from seedling infected with Agrobacterium tumefaciens strain C58pMP90 (pBI101-pPsTrxh or pTaHMW). Plasmid pPsTrxh::GUS or pTaHMW::GUS and genomic DNA from plant transformed with empty cassette were used as positive and negative control respectively. A. Analysis on 1% agarose gels of different lines of transgenic wheat (Triticum aestivum cv Soissons); negative control (1), wheat transformants (2-5), positive control (6), molecular size markers (M). B. Different transgenic plants: Arabidopsis (1); Sorghum (2); Maize (3); Wheat (4), positive control (5); size marker (M).
152x139mm (150 x 150 DPI)

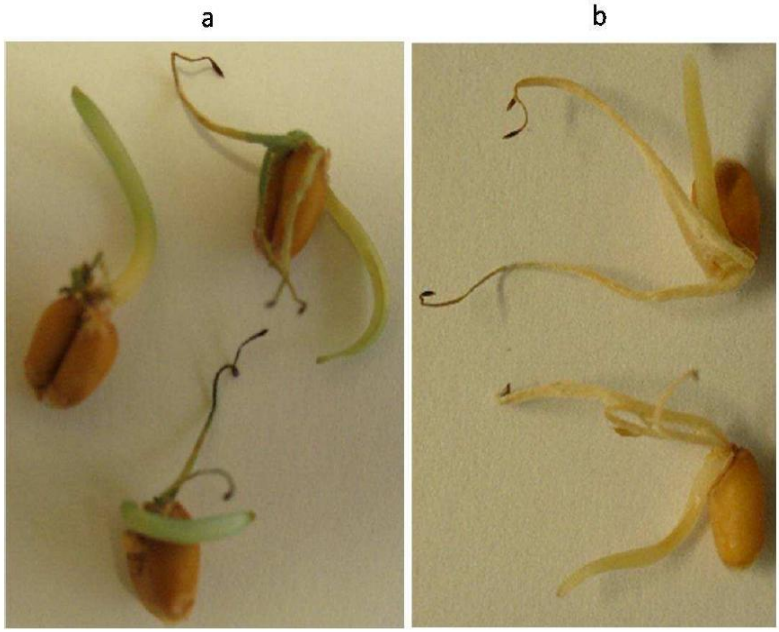


A. GUS staining is localized in the sorghum shoot apex and downward (a); negative control (b).
148x129mm (150 x 150 DPI)



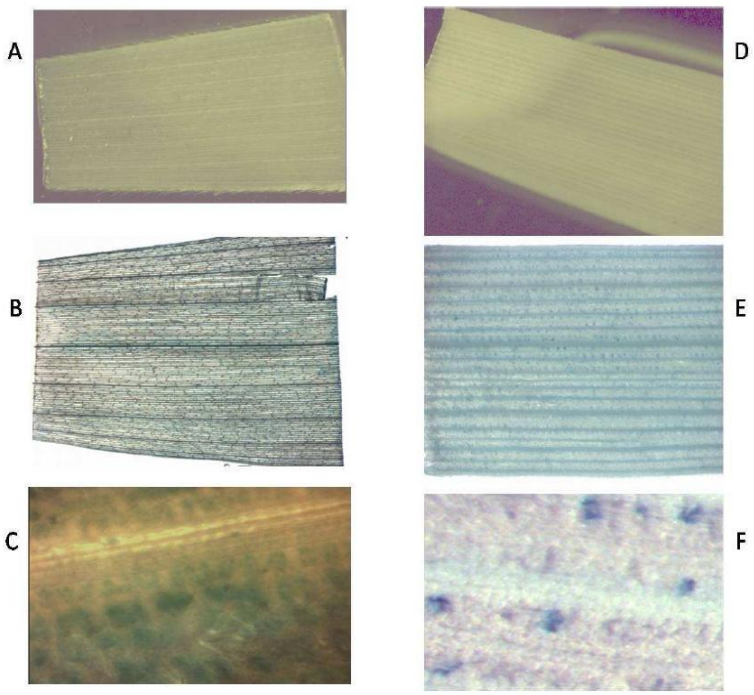
B. Staining is localized on the coleoptiles in maize seedlings (a); negative control (b).
151x119mm (150 x 150 DPI)

-view



Staining localized homogeneously in the coleoptile and radicula and side roots in wheat seedlings (a); negative control.
180x138mm (150 x 150 DPI)

view

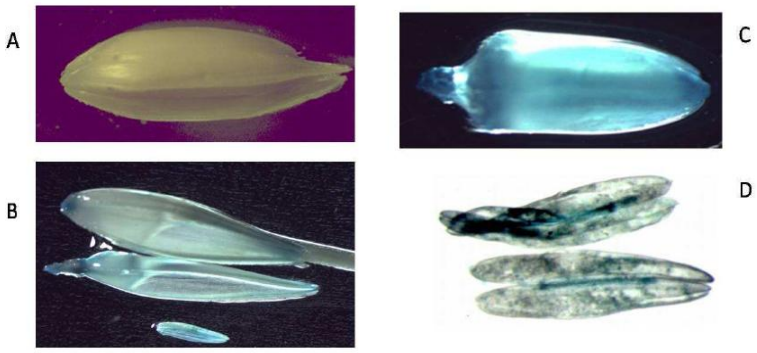


Histochemical localization of GUS activity in transgenic lines of maize (A, B, C) and wheat (D, E, F) plants expressing the UidA reporter gene under the control of PsTrxh promoter. After staining, leaves fragments were then distained with 70% ethanol at 37°C to remove green background. GUS staining was detected in vascular tissues from the green organs such as leaves (B, E). Close-up view showing distribution of micro patches of blue on the vascular tissues in maize and wheat leaves respectively (C, F); negative control (A, D).
200x163mm (150 x 150 DPI)



GUS gene expression in T1 wheat seedling expressing the pPsTrxh::GUS cassette. Seeds were allowed to germinate in the dark under controlled, sterile conditions on filter paper soaked with water in Petri dishes. Staining is localized in the scutellum and the coleoptile in a germinating seed 48h after imbibition.
140x81mm (102 x 102 DPI)

Review



Transient GUS gene expression in wheat seed from T0 plants expressing the pTaHMW::GUS cassette. A. Negative control. B. GUS activity was visible in florets from young inflorescence. C. GUS Expression observed in the whole immature seed 10 days after anthesis. D. Split seed showing a distribution of blue colour patches in the endosperm in an immature seed (10 days after anthesis). 223x91mm (150 x 150 DPI)

eer Review

Conclusion et perspective

Les méthodes de transformations de certaines plantes par *Agrobacterium* comme *Arabidopsis thaliana* est actuellement sous control. Cependant la transformation et l'amélioration des autres plantes, et particulièrement les céréales restent difficiles. Ainsi la mise en place d'une méthode de transformation adaptée aux plantes récalcitrantes, est nécessaire pour comprendre le fonctionnement des gènes et des protéines, et par conséquent l'amélioration des plantes. L'établissement de systèmes de transformations génétiques fiables pour les céréales, est d'une grande importance pour l'introduction de caractères phénotypiques comme la valeur nutritive, la résistance aux conditions environnementales.

En comparant la méthode décrite dans la littérature par Sahrawat et Lorz, 2006, Le développement de cette méthode smilplifiée, a permis de réduire le nombre d'étapes et de cultures cellulaires, ainsi que le temps nécessaire pour régénérer des plantes transgéniques.

Les graines de plantes constituent le moyen traditionnel de conservation des céréales, et de préserver leur capacités à la germination. Ainsi cette méthode basée sur l'utilisation directe des graines pour produire des plantes transgéniques, évite de passer par des étapes de cultures in vitro. La mise en place de cette méthode, a permis l'obtention de plantes transformées, avec une expression stable dans la génération T1 pour le blé. Les fréquences de transformations sont identiques à celles obtenues avec les autres méthodes, pour le blé et le maïs, mais elles sont plus élevées pour le sorgho (Nguyen et al., 2008). Un autre résultat très important de cette méthode rejoint celui déjà obtenu avec la méthode traditionnelle de transformation des plantes par *Agrobacterium*, il concerne le nombre de copie introduit après transformation. En moyenne une copie de gène d'intérêt a été introduite dans le génome de la plante. Ce qui évite des effets mutationnels dans les générations suivantes (Jones et al., 2005).

De façon générale, Cette méthode mise en place, pourra être utilisée dans la transformation de toutes les céréales, voir même élargie pour les autres plantes, et particulièrement les plantes récalcitrantes à la transformation. Elle permettra par exemple chez le sorgho d'éviter la production de pigments et antioxydants, qui rendent difficile la transformation de cette plante in vitro (Hagio et al., 2002; jeoung et al., 2004; Gao et al., 2005;Nguyenetal.,2008).

Partie v

Discussion générale

Grâce à leur implication dans des différents processus biologiques et physiologiques, les rédoxines constituent des marqueurs intéressants pour aborder la qualité germinative des céréales. Depuis une trentaine d'année, les thiorédoxines ont été les principales rédoxines étudiées, mais les études des glutarédoxines et des peroxyrédoxines ont beaucoup progressé dernièrement. Ainsi plusieurs isoformes de ces rédoxines, et leurs protéines cibles ont été identifiées. Ces découvertes ont permis de montrer des implications multiples des Trxs, des Grxs et des Prxs dans diverses voies métaboliques de la plante.

Les plantes contiennent de multiples isoformes de Trxs *h*. La taille du génome du blé tendre est le principal frein à son séquençage, ce qui peut expliquer la relative méconnaissance des systèmes rédoxines de cette plante. Néanmoins, un certains nombres de gènes ont été isolés et étudiés chez le blé (Gautier et al., 1998; Serrato et al., 2001; Serrato et al., 2002; Cazalis et al., 2006), alors que chez d'autres plantes comme *Arabidopsis thaliana,* huits gènes codant pour des Trxs *h* (Meyer et al., 2002, 2005) et trois isoformes NTR (Serrato et al., 2004; Reichheld et al., 2005), et au moins neuf systèmes Trxs *h* ont été caractérisés dans le riz (*Oryza Sativa*). En outre, l'analyse des données EST du blé montre l'existence d'autres isoformes en fonction du cultivar.

Ainsi notre étude s'est focalisée dans un premier temps sur l'identification de nouveaux isoformes de rédoxines comportant une information additionnelle par rapport aux gènes déjà identifié chez Soissons, le cultivar modèle utilisé au laboratoire d'agrophysiologie. Le criblage des banques EST a permis de retenir une nouvelle isoforme de Trx *h*, nommée *h*4. Cependant, pour les Grxs et les Prxs, le criblage n'a pas permis d'isoler de nouvelles isoformes. Il serait peut être plus judicieux d'utiliser des séquences de références d'autres groupes pour les Grxs par exemple pour effectuer le criblage. Présentant des propriétés différentes par rapport à celles des autres Trxs *h* du système modèle, la Trx *h*4 a été intégrée dans le système modèle et cela a permis de l'enrichir. En effet l'exploitation des propriétés d'un grand nombre de Trxs *h* serait déterminante dans la compréhension de leurs fonctions de leurs implications dans des voies métaboliques que ce soit lié à la qualité germinative, ou la qualité technologique.

Les analyses bioinformatiques ont prédit tout d'abord des informations importantes sur les propriétés des différentes Trxs *h* identifiées. Elles ont montré des différences de structures et principalement la prédiction du comportement de ces isoformes vis-à-vis des molécules de leur milieu et donc les molécules cibles dans la plante.

Les Trxs *h* sont connues pour être des agents de transduction d'information et en particulier de pouvoir réducteur entre les différents organes de la plante. Elles ont souvent été liées à la remobilisation des protéines de réserve dans les semences (Jiao et al., 1993; Lozano et al., 1993). Lors de la germination, les protéines de réserve sont réduites ce qui permet de faciliter leur mobilisation, nécessaire à la nutrition de l'embryon. Les Trxs *h* sont aussi impliquées dans l'inactivation des inhibiteurs des amylases et dans l'activation d'une protéase spécifique : la thiocalsine. L'ensemble de ces mécanismes permet de faciliter la mobilisation d'azote et de carbone dans l'endosperme (Marx et al., 2003; Yano et al., 2001).

L'étude des interactions de ces Trxs *h* avec les protéines de réserve de blé, a été effectuée pour discriminer les Trxs *h* sur la base de leur pouvoir réducteur vis-à-vis des cibles que sont les gliadines et les gluténines, responsables respectivement de la viscosité et l'élasticité de la pâte de farine. L'étude a mis en évidence non seulement des différences au niveau de l'interaction réductrice avec les cibles mais aussi une activité oxydante.

Les protéines de la fraction gliadique contiennent des protéines de différentes masses moléculaires (30 à 50 kDa) correspondants au α, β, γ gliadines, dans lesquelles il y a très peu de résidus libres de cystéines. Les interactions de ces protéines avec les différentes Trxs *h*, induit la réduction des ponts disulfures, comme démontré auparavant dans les travaux de Kobrehel et al., 1992. L'activité réductase de ces Trxs *h* peut être classé dans l'ordre croissant suivant Trx *h*4 < Trx *h*3 < Trx *h*2 < Trx *h*1. La Trx *h*1 présente une activité réductrice plus élevée par rapport aux autres Trxs *h* du blé (Cazalis et al., 2006; Zahid et al., 2009p). Cette activité réductrice rend la Trx *h*1 importante, et l'exploitation de cette fonction serait un moyen pour évaluer son effet sur les qualités germinative et technologique. Ces résultats confirment les aptitudes des Trxs *h* à réduire les protéines de l'endosperme du blé.

L'interaction de la Trx *h*1 avec les protéines des fractions gliadiques et gluténiques induit un autre phénomène. Il s'agit de la formation de polymères protéiques de hauts poids moléculaires. Les analyses par western blot ont confirmé l'association de la Trx *h*1 avec ces polymères de haut poids moléculaires. Cette nouvelle fonction a été attribuée à la présence de la cystéine (Cys11) en amont du site actif, et permet de distinguer des polymères qui se seraient formés de manière stochastique, suite à la réduction de ponts disulfures. Ce travail souligne ainsi l'ambivalence potentielle des Trxs *h*, et en particulier, celle de la Trx *h*1 mise en évidence dans cette étude.

La réduction des protéines de réserve par les Trxs *h*, favorise la diminution de l'allergénicité des aliments à base de gluten pour les personnes sensibles (Bucchanan et al., 2000; Matsumato et al., 2007; Waga et al., 2008). Grâce à cette fonction, les Trxs *h* peuvent être utilisées pour produire des aliments hypo-allergènes. L'étude de l'effet réducteur des Trxs *h* sur les propriétés rhéologiques de la pâte, a permis une amélioration de la consistance de la pâte lors du pétrissage, en favorisant une forte absorption de l'eau, et l'augmentation de la viscosité de la farine (Wong et al., 1997; Waga et al., 2008), cette caractéristique résulte de la spécificité des Trxs *h* vis-à-vis des protéines de réserve du blé. La présence de molécules comme le glutathion et le dithioreitol (DTT), n'a pas d'effet similaire à celui des Trxs *h* sur la qualité de la pâte. D'autres travaux, montrent que l'addition de Trxs *h* à la farine de céréales comme le riz et le sorgho, conduit à la formation d'une matrice de pâte limitée et un début de pain relevé (Buchanan et al., 2000).

Ces données ouvrent des perspectives technologiques pour la modulation de polymères protéiques responsable de la qualité technologique, et les problèmes d'allergénicité de la farine du blé. Le développement des plantes transgéniques peut être une alternative sérieuse pour répondre à la demande de l'industrie agroalimentaire.

Cependant, le résultat obtenu avec la Trx *h*1 en formant des polymères après interaction avec les protéines du gluten, peut poser le problème inverse en favorisant le développement des propriétés allergènes des aliments. Un équilibre doit être donc trouvé lors de la modulation des gènes de la Trx *h*1 dans des grains de blé, car il peut y avoir des effets antagonistes entre les deux qualités.

La cœxistence de multiples isoformes de Trxs *h* est toujours énigmatique. Le problème est accentué par la méconnaissance des rôles de chaque isoformes dans le réseau redox du cytosol, du réticulum endoplasmique ou de la mitochondrie. Ces données accentuent la nécessité de caractériser individuellement les isoformes de Trxs *h* sur la base de leurs localisations *in vivo*, des résidus chargés et hydrophobes, déterminants dans les propriétés d'interactions avec les protéines.

L'étude entreprise dans ce travail, a confirmé également l'implication des Trxs *h*, de la Grx et de la 1-Cys-Prx dans la protection contre le stress oxydatif. Les 1-Cys-Prx étant spécifique du grain, elles s'expriment pendant les premières phases de germination, après imbibition. En présence de la laminarine (un éliciteur), cette expression devient plus sensible dès le début de la germination par rapport aux conditions témoins. Ce résultat, confirme le

rôle des 1-Cys-Prxs dans la protection contre le stress, et le rôle de la laminarine dans la stimulation des fonctions de défenses des plantes. L'expression de ces protéines dès le début de la germination, est liée à leur accumulation pendant la phase de maturation, où elles sont impliquées également dans la protection contre le stress oxydatif lors de, la dessiccation. D'autres travaux auparavant ont montré que les 1-Cys-Prx sont impliquées dans la protection contre les ROS liés au stress oxydatif (Haslekas et al., 2003; Stacy et al., 1996). De même, la surexpresion de 1-Cys-Prx dans des plantes de tabac, favorise la résistance au stress oxydatif, évitant le développement de lésions nécrotiques. Dans les promoteurs de la 1-Cys-Prx de l'orge et d'*Arabidopsis thaliana* (AtPer 1), des éléments responsables des réponses au stress oxydatif ont été identifiés (Haslekas et al., 1998; Aalen, 1999).

Les éléments du système antioxydant et particulièrement la catalase, sont connus par leur implication contre le stress oxydatif (Kim et al. 2005; Khosravinejad et al 2008). En outre, la catalase constitue une enzyme majeure dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène. Cependant en présence d'une faible concentration de laminarine, l'activité de cette enzyme ne diffèr de celles du témoin que tardivement pendant la germination. Contrairement à la 1-Cys-Prx, la CAT est moins sensible aux conditions crées par la laminarine, durant les premières étapes de la germination, et particulièrement après imbibition. Ainsi, nous avons mis en évidence les propriétés de la laminarine dans la stimulation des moyens de défense des plantes, et particulièrement l'expression de la 1-Cys-Prx.

Quelques études ont supposées l'implication de la 1-Cys-Prx dans le maintien de la dormance (Gold-mark et al., 1992; Stacy et al., 1996; Haslekas et al., 1998), mais les travaux de Haslekas et al., 2003 ont plutôt confirmé l'importance de la 1-Cys-Prx dans la protection contre le stress oxydatif. En se basant sur cette étude, la 1-Cys-Prx peut être considéré comme un indicateur de l'état redox du grain lors de la germination.

Chez les mammifères, les isoformes des Prxs sont localisés dans le cytosol, le noyau et la mitochondrie (Wood et al., 2003). Alors que chez les plantes, des séquences de peptide signal NLS ont été identifiées à l'extrémité C-terminale (Stacy et al., 1999; Mowla et al., 2002), ainsi ces Prxs sont principalement localisées dans le noyau des embryons en développement et dans les cellules aleurones (Pulido et al., 2009).

La mise en évidence de l'implication des Trxs *h* dans la protection contre le stress simulé par la laminarine a été également étudiée. L'analyse par western blot de l'expression

des Trxs *h* en présence de la laminarine, montre la présence de trois isoformes de Trxs *h*. Malgré leur implication contre le stress oxydatif, les Trxs *h* ne montrent pas un profile d'expression différent par rapport au témoin. L'effet du stress n'est visible qu'à 72h après le début de la germination, par la persistance de l'expression des trois isoformes. Il a été montré que les conditions environnementales ou les stress abiotiques, ont un faible effet sur l'expression des Trxs *h* durant les premières phases de germination, à l'exception de la couche aleurone (Cazalis et al., 2006). D'autres études ont montré l'expression des Trxs *h* dans des conditions de stress, par une forte accumulation des ces dernières dans les tissus vasculaires et dans le noyau de cellules souffrant de stress oxydatif (Serrato et al., 2001; Serrato et Cejudo, 2003).

Le couple formé de la 1-Cys-Prx et des Trxs *h* constitue un moyen de défense pour les grains principalement en phases de germination et/ou de dessiccation. Des études ont décrit que les Trxs *h* sont responsables de l'activation des Prxs (Wong et al., 2003). Cependant aucun mécanisme défini d'activation de cette enzyme n'a pas été décrit auparavant dans le grain. Les protéines de Trxs *h* ainsi que leur système de réduction NTR sont très abondants dans les grains des monocotylédones (Guatier et al., 1998; Serrato et al., 2001, 2003; Cazalis et al., 2006; Shahpiri et al., 2008) et des dicotylédones (Alkhalfaoui et al., 2007). Le système NTR/Trx *h* joue différents rôles principalement, la mobilisation des protéines de réserve, et l'implication dans la protection contre le stress oxydatif. Ces données suggèrent l'association de la 1-Cys-Prx et du système NTR/Trx *h* aux réponses antioxydantes.

Récemment des études ont pu montrer l'implication du système NTR/Trx *h* dans l'activation des 1-Cys-Prx dans des conditions de stress (Pulido et al., 2009). Des analyses par immuno-localisation révèlent la présence du système NTR dans le noyau des graines, de même que par des analyses par western blot (Pulido et al., 2009). Toujours dans le même travail, il a été montré la co-localisation de la 1-Cys-Prx et le système NTR/Trx *h* dans le noyau des grains de blé.

Contrairement aux 1-Cys-Prxs qui contiennent une extrémité NLS permettant à ces dernières de passer dans le noyau, ce motif est absent dans le système NTR/Trx *h*. Mais grâce a leur faibles poids moléculaires, de l'ordre de 40 kDa, ces protéines peuvent passer dans le noyau par une diffusion passive (Lange et al., 2007). La localisation nucléaire de la 1-Cys-Prx, ainsi que son rôle dans la protection ont été établi (Stacy et al., 1996; Pulido et al., 2009). La présence du système NTR/Trx *h* dans le noyau suggère le rôle de ce dernier dans

l'activation de la 1-Cys-Prx. Il se trouve que cette activité dépend principalement du NTR et du NADPH et pas de la Trx *h* (Pulido et al., 2009). Cette nouvelle activité du NTR dans la réduction des 1-Cys-Prxs permet aux graines de plantes d'avoir une activité antioxydante, activité qui peut avoir des fonctions physiologiques. Le noyau constitue aussi la source de production d'hydrogène de peroxyde (Ashtamker et al., 2007), ainsi par le contrôle du niveau de ce dernier, le système NTR/NADPH/1-Cys-Prx, contrôle l'état redox des protéines nucléaires, nécessaire à l'expression des gènes, tel que les facteurs de transcription soumis à des régulation redox. Ce système semble présent dans les cellules humaines, où le système NTR est impliqué dans la régulation des facteurs de transcription en réponse au stress oxydatif (Smart et al., 2004).

Les données de la littérature, montrent le rôle du système NTR/NADPH et de la 1-Cys-Prx dans la protection contre le stress oxydatif (Pulido et al., 2009). Le stress oxydatif est lié à une forte production des ROS, et ces dernières sont connues depuis longtemps pour leur importance dans la réponse des plantes aux contraintes environnementales. Les symptômes observés en situation de stress sont la conséquence d'une forte accumulation de radicaux libres oxygénés et d'une altération de l'homéostasie cellulaire. Les ROS sont produites pendant un métabolisme normal de la plante, mais l'augmentation de leur concentration intracellulaire est souvent synonyme de stress.

Cependant, malgré leur nature extrêmement réactive, les ROS ne sont pas uniquement impliquées dans des réponses délétères chez les végétaux. De nombreuses études ont montré que les ROS peuvent aussi intervenir dans les signalisations responsables de l'induction et de la régulation de nombreux gènes de défenses (protéines chaperonnes, heat Shock Proteins; enzymes antioxydantes, ascorbate peroxydase (PAX), glutatione-S-transferase (GST); gènes liés à la pathogénèse (PR) (Larkindale et al., 2005; Zago et al., 2006). Les ROS sont désormais aussi considérées comme agents régulateurs de la mort cellulaire programmée (PCD) chez les plantes (Dat et al., 2003; Van Breusegem et al., 2006). Ce processus de mort cellulaire, actif et contrôlé génétiquement, se retrouve tout au long de la vie des plantes. En effet différents types cellulaires ou organes sont éliminés, au moment approprié, au profil de l'organisme et de la population, ils constituent des modèles de la PCD végétale. Au cours du développement, la PCD est impliquée dans de nombreux phénomènes comme la germination (couche aleurone), la différentiation des vaisseaux conducteurs de la

sève brute et élaborée, la croissance (coiffe racinaire), la reproduction (tube pollinique), ou bien encore la sénescence (feuille).

Pour faire face aux concentrations élevées de ROS et donc au stress oxydatif, une surexpression de la Trx *h*1 et/ ou la 1-Cys-Prx serait un moyen pour augmenter la résistance aux effets négatifs des ROS. Pour mettre en évidence l'implication des rédoxines dans la protection contre le stress, la modulation de l'expression des gènes de ces dernières a été entreprise, principalement par l'inhibition de l'expression des gènes. Dans notre étude, nous montrons que l'inhibition de Trx *h* et/ou de Grx induit un effet limité dans le développement des plantules. Cette inhibition se traduit par une vulnérabilité au stress oxydatif généré par le stress thermique. Chez *Arabidopsis thaliana,* des travaux identiques ont montré qu'une inhibition sélective de Trx *h* n'avait aucun effet phénotypique (Yves Meyer, communications personnelles), ce résultat peut être expliqué par des réactions de compensation due au nombre d'isoformes de la Trx *h*. D'autres travaux (Voinnet et al., 1998; Palauqui et al., 1999; Rutherford., 2004), ont montré qu'après interférence ADN, le phénotype est moins marqué qu'après une interférence RNAi.

Même si des contrôles externes manquent dans cette étude concernant l'effet de l'inhibition sur l'expression des gènes, le suivi de l'expression des gènes après inhibition par chaque isoforme de Trx *h* ou de la Grx, montre un effet sur l'expression des autres isoformes. Cet effet peut être expliqué par les similarités entre les séquences des isoformes de Trxs *h* étudiées. Les effets se voient aussi par l'inhibition des Trxs *h* par les Grxs, ce résultat est rarement démontré dans la littérature. Cependant, l'activation des Trxs *h* par des Grx à été montré dans quelques travaux (Gelhaye et al., 2003; Reichheld et al., 2007).

Toujours dans le but de comprendre et d'évaluer l'implication des Trxs *h* en particulier et les autres rédoxines en général dans la protection contre le stress. Nous avons voulu surexprimer les isoformes de la Trx *h*1 pour ces diverses propriétés. Ainsi, dans un premier temps, nous avons commencé par mettre en place une méthode simple et efficace pour rendre la transformation des céréales par *Agrobacterium tuméfaciens* plus accessible. Les résultats obtenus avec cette méthode sont encourageants et constituent une première base dans la simplification de la transformation génétique des céréales. Néanmoins cette méthode reste empirique, nécessitant d'avantage de mise en point et d'optimisation. Faute de temps, nous n'avons pas surexprimé la Trx *h*1 afin de mesurer son importance principalement dans la

gestion de stress et dans un deuxième temps les effets sur la qualité technologique du grain de blé.

La modulation de l'expression des Trxs par surexpression ou par inhibition a fait l'objet de quelques études qui permet de confirmer ou d'affirmer l'importance de ces marqueurs dans des processus comme la germination et/ou la formation des agrégats protéiques. Il a été montré que la surexpression des Trxs *h* par la production de plantes transgéniques de l'orge favorise la germination (Wong et al., 2002), cependant une inhibition par la technologie anti-sens des Trxs *h* dans des plantes de blé retarde ce processus et provoque des effets mesurables sur la taille des agrégats (Guo et al., 2007).

Partie IV

Conclusion générale et perspective

Dans cette étude, nous avons caractérisé une nouvelle Trx *h*, la Trx *h*4. Elle a été intégrée dans notre système modèle. Une étude individuelle de chaque isoforme, permettra de comprendre d'avantage la physiologie des semences du blé. Les autres isoformes de Trxs *h*, de Grxs et de Prxs isolées ne présentent pas de différences particulières par rapport aux isoformes de départ, dont les propriétés peuvent apporter des réponses dans la compréhension des processus métaboliques, et particulièrement les processus de germination. Les études des propriétés différentielles des Trxs *h* après interaction avec les protéines de réserve du blé et les protéines de l'endosperme du maïs, ont permis de confirmer l'activité réductrice de ces dernières que ce soit avec l'insuline ou avec les protéines des fractions gliadiques et gluténiques, et la mise en évidence du pouvoir réducteur de la Trx *h*1. Le pourvoir réducteur de la Trx *h*1 contribuera certainement à une meilleure protection contre le stress oxydatif, par rapport aux autres isoformes. En outre, nous avons mis en évidence la propriété oxydante de la Trx *h*1.

Même si l'effet est très limité au niveau phénotypique, nous avons montré le rôle des Trxs *h* et des Grxs dans le développement des plantules contre le stress oxydatif provoqué par un stress thermique. L'application de molécules comme la laminarine pendant les phases de germination, a permis de discriminer l'implication de chaque élément dans la protection contre le stress oxydatif. Se travail souligne l'importance de la 1-Cys-Prx dans la sensibilité aux conditions environnementales lors de la germination des grains de blé.

Vu le pouvoir réucteur de la Trx *h*1, une surexpression de ette dérnière sous le contrôle du promoteur 35S CaMV (du virus de la mosaique du chou-fleur (CaMV)) dans la plante peut être envisagée, afin de mesurer le rôle de cette dernière dans la gestion du stress. Grâce à sa fonction oxydante, une surexpression spécifique de la Trx *h*1 dans l'endosperme en utilisant un promoteur d'HMW par exemple, serait intéressant à réaliser pour mettre en évidence *in vivo* la propriété de la Trx *h*1 dans les phénomènes de cross-linking et les éventuelles répercutions sur la qualité technologique.

Vu son rôle dans la lutte contre les stress, il serait intéressant de surexprimer la 1-Cys-Prx, et de suivre le développement de la plante depuis la germination jusqu'à la maturation. La surexpression de cette protéine ne posera pas de problème pour la qualité technologique, puisqu'elle n'interagit pas avec les protéines de réserve du blé comme le cas pour les Trxs *h*.

Des travaux ont montré la présence des Trxs *f* et *m* dans les tissus non photosynthétique (Haberlin et al., 1995; Mestro-Ortega et Meyer, 1999; Pagano et al., 2000;

Collin et al., 2004). Récemment Balmer et al., 2006a, ont identifié un système ferredoxine-Trx dans les amyloplastes de l'endosperme du blé, composé de ferredoxine, NADP ferredoxine réductase et ferredoxine-Trx réductase. En outre, des travaux récents prouvent la forte localisation des Trxs *f* et *m* dans les tissus non photosynthétique du petit pois (*Pisum sativum* L. cv Lincoln), dans les racines, le système vasculaire, la graine et le pollen (Baraja-Lopez et al., 2007; Traverso et al., 2008). Dans les tissus hétérotrophes, les Trxs *f* et *m* pourraient être impliquées dans le contrôle redox des cellules en prolifération pendant la croissance cellulaire. Ces données ouvrent ainsi la possibilité à de nouveaux rôles des Trxs *f* et *m*, dans la protection contre le stress oxydatif. A cause du rôle central des amyloplastes dans l'endosperme, des analyses de fonctions spécifiques de ces Trxs dans les tissus du grain, contribuera certainement à une meilleure compréhension de la physiologie du grain.

ANNEXE 1: INTERACTION OF THIOREDOXINS H WITH MAIZE ENDOSPERM PROTEIN FRACTIONS

ZAHID, A ET CAZALIS, R

IN PLANTAS C4 Y CAM, ED. J. L. GONZALEZ REBOLLAR, EDITORIAL: SERVICIO DE PUBLICACIONES DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC) CON LA COLABORACION DE LA FUNDACION.

Interaction of thiorédoxines h with Maize endosperme protein fraction

Abderrakib Zahid and Roland Cazalis

Laboratoire d'Agrophysiologie
EI Purpan, 75 voie du Toec, BP 57611, 31076 Toulouse cedex 3 France
Corresponding author: roland.cazalis@purpan.fr

ABSTRACT

Biotechnologies have still much work to do on their side in the effort made to improve food quality. Trx are known to be small ubiquitous reductases, being able to modulate gluten rheological quality and to lower allergenicity of products deriving from cereals flour. This present report analyzes the interaction of three Trx*h* as well as E coli Trx on maize endosperm protein fractions. The data confirm the capacity of these proteins to reduce intra or / and intermolecular disulphides bridges, thus releasing free thiol groups which are identifiable by mBBr labelling. Trx*h*1 which has an additional cysteine in its N-terminal domain shows a great capacity to form high molecular weights protein network. There is thus a correlation between these proteins properties underlined in vitro and their interactions characteristics with target proteins. Because these interactions can theoretically be done with any Trx, from chloroplast, animal, yeast, bacterial or whatever, this opens many possibilities to intervene on raw material in vivo or in planta to improve food quality and safety.

Abbreviations: PMSF , phenylmethylsulfonyl chloride ; mBBr, monobromobimane ; TCA, trichloroacetic acid ; DTT, dithiothreitol.

INTRODUCTION

Food insecurity and malnutrition continue to be the major developmental challenge in the beginning of the 21st century. Nearly 200 million children younger than five years are undernourished for protein, leading to a number of health problems, including stunted growth, weakened resistance to infection and impaired intellectual development. In addition, malnutrition in the form of obesity is also increasing in several developing and developed countries. Efforts to overcome poverty must take into account various factors as the food consumption habits, food nutritional status, cropping system practiced, public policies and countless other factors. In spite of the significant advances made in genetic enhancement of crop plants for nutritional value, science and technology have to play a great role in the long-term global strategy for the fight against malnutrition.

Since the impact of cereal in worldwide nutrition, increases in the productivity of cereal grain crops have helped many developing countries achieve self-sufficiency in meeting the energy requirements. Maize (*Zea mays* L) is world's one of the three most popular cereal crops for both livestock feed and human nutrition. With its high content of carbohydrates, fats, proteins, some of the important vitamins and minerals, maize is the main food of the lower-socio-economic populations and in some regions it represent more than 80% of daily food consumption.

The maize kernel, like that of other cereal grains, includes pericarp (6%), endosperm (82%) and germ (12%) (Watson, 1987). The main structural component of the endosperm is starch, a complex carbohydrate that constitutes on an average 71% of the grain and is a source of concentrated energy. Most of the protein in a mature maize kernel is contained in the endosperm and the germ, but the endosperm protein is low in quantity as well as quality. In contrast the germ protein is sufficiently superior in quantity and quality. In normal maize, proportions of various endosperm storage protein fractions, on an average, are: albumins (3%), globulins (3%), zeins (60%) and glutelins (34%) (Salamini and Soave 1982). Zeins are characterized by a high content of glutamine, leucine and proline and are devoid of lysine and tryptophan. Since zeins are the main protein in normal genotypes, they considerably dilute the contribution of these essential amino acids witch are in balanced content in the non-zeins

proteins. The need to ameliorate the nutrition value of cereal grains and maize ones in particular was well known (Osborne and Mendel, 1914)

Serious efforts to improve the nutritional quality of maize endosperm protein began in the mid-60 and find a breaking point with the discovery of the biochemical effects of mutant alleles opaque-2 and floury-2 by the Purdue university researchers (Mertz et al., 1964; . Nelson et al., 1965), witch made grain protein in the endosperm nearly twice as nutritious as those found in normal maize. A continuing search for identifying new and better mutants has been underway during the past several decades. In spite of the discovery of new mutants such as opaque–7, opaque-6, floury-3, mucronate and defective endosperm, none offered any additional advantage over opaque-2 in maize breeding program.

Various strategies to improve quality protein maize were underway, but all them require long-term efforts to achieve lysine levels matching the specific mutants which give a big boost in lysine content. One of the approaches exploits double mutant combination; other is based on the use of two genetic systems involving opaque-2 gene and the genetic modifiers of the opaque-2 locus (Vassal, 2000; Prasanna et al., 2001), and has been quite successful.

Genetic modification involving artificial altering of the genetic material of a species was one the alternative strategies developed in the 80. Crops have been engineered to confer various benefits, such as increased yield and pest and weed resistance, resulting in reduced reliance on pesticides and herbicides, enhanced taste, drought resistance and aesthetic appeal, improved nutritive value, and longer shelf life (Falk et al., 2002). In this area, different transgenic cereals with elevated thioredoxin h (Trx*h*) levels in seeds were obtained showing value-added traits (Cho et al, 2007). Among these transgenic plants, wheat seed products appear less allergenic and more digestible whereas in barley seed, the appearance of alpha-amylase is accelerated and its abundance and activity are increased. In se same way, an advance of germination rate is observed with barley seeds (Cho et al.1999; Wong et al., 2002).

Plant Trx*h* is involved in a wide variety of biological functions and the presence of its multiple forms has also been reported in plant seeds (Bestermann et al., 1983). Trx*h* belongs to the redoxins family of small (12-14 kD) thermostable proteins with catalytically active disulfide groups. This class of proteins has been found in virtually all organisms, and has been implicated in myriad biochemical pathways (Buchanan et al., 1994). The active site of Trx has

two redox-active cysteine residues in a highly conserved amino acid sequence; when oxidized, these cysteines form a disulfide bridge (-S--S-) that can be reduced to the sulfhydryl (-SH) level through a variety of specific reactions. In physiological systems, this reduction may be accomplished by reduced ferredoxin, NADPH, or other associated thioredoxin-reducing agents.

Because of the quality of the reduced form, the addition of Trx promotes the formation of a protein network that produces flour with enhanced baking quality. Furthermore, Kobrehel et al., (1994) have shown that the addition of Trx to flour of non-glutenous cereal such as rice, maize, and sorghum promotes the formation of a dough-like product.

Although Trx*h* have a homogeneous conformation, the particular microstructures of each protein are able to modulate determining effects in protein-protein interactions. It is therefore possible to modulate either dough rheological qualities or to obtain more targeted effects within the framework of an overexpression of a specific Trx in the grain. In this present report, we analyze the behaviour of different Trx against protein fractions from maize endosperm.

MATERIALS AND METHODS

Protein extraction:

Seed wheat Trx*h* were obtained as previously described (Cazalis et al, 2006). E. coli Trx was purchase from Promega. Maize (*Zea mays* L.) seeds from inbred line, FG89, were ground in a M20 mill (IKA-WERKE) to pass 0.5 mm sieve. An Osborne fractionation was performed on 200 mg meal. Each extraction step was carried out with 1 mL of solvent by mixing vigorously and placing the microfuge tubes on a rotator for 2h. Between each fraction, the remaining meal was washed with water and the supernatant disregarded. The F1 fraction was extracted with 50 mM Tris, pH 7.9, and 1mM PMSF (Sigma) buffer. F2 fraction was extracted with 70% (v/v) ethanol. Centrifugations were all performed at 12 000 *g* for 5 min in a microcentrifuge and samples then stored at -20°C. Fraction F2 was concentrated at 4°C on Ultracel 5K centrifugal filter unit (Millipore) according manufacturer instructions. Protein concentrations were determined by the Bradford method (Bradford, 1976), with Bio-Rad reagent and BSA as a standard.

Protein interaction

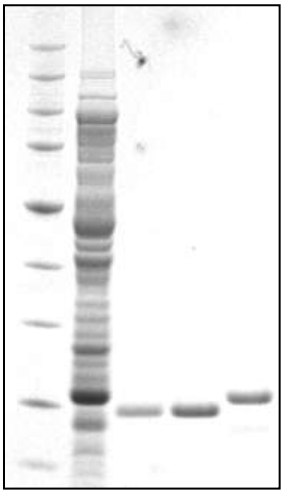
Protein fractions were stepwise reduced with DTT (Lindsay and Skerrit, 1998). For the maize seed endosperm protein interaction with Trx, 1mM Trx*h*, previously reduced by 2 mM DTT was added to 60 µg protein extract and incubed at 30°C for 30 min. samples were then applied to the gels for electrophoresis in non-reducing condition. In vitro protein mBBr labelling was carried out according Khobrehel et al (1992) with some adaptations. Protein interaction was performed as previously described. 400 nmol of mBBr was then added and the reaction was continued for another 15 min. 40 µl of a buffer (Tris 0.5M; pH 6.8; 4% SDS; 5 mM 2-mercaptoethanol; 10% glycerol; 0.005% bromophenol blue) was added to stop the reaction and derivatize excess mBBr , and the reaction continued for another 30 min at room temperature. Samples were then directly applied to gel. Following electrophoresis, gels were placed in 12% (w/v) TCA and soaked for 1 hr. Gels were then transferred to a solution of 40% methanol and 10% acid acetic overnight to remove excess mBBr. Fluorescence was visualized under UV light (365 nm). Gels were then stained with coomassie brilliant blue R-250 in 40% methanol/10% acetic acid for 2 h and destained overnight in the previous buffer without coomassie.

RESULTS AND DISCUSSION

Thioredoxins

The Trx*h* used are characterized by different molecular mass (fig. 1A) due principally to the extension of the N-terminal domain of the protein. Trx*h*1, in addition to exibit a low molecular weight, is characterized by a supplementary cysteine residue (Cys 11) in this domain upstream of the very typical active site WGGPC (Fig.1B). The presence of this additional cysteine residue was reported in Trx*h* from monocots as well as from dicots (Ishiwatari et al., 1995; Gelhaye et al., 2003; Maeda et al., 2003). About Trx*h*1, it was shown that Cys-11 residue was more implied in dimer formation events than in reductase activity (Cazalis et al, 2006). Trx*h*1 is also characterized by having a phenylalanine residue (Phe17) at the N-terminus instead of the typical tryptophan residue which was usually seen as a Trx*h* protein signature (Stein et al, 1995). Trx*h*2 has a standard profile. Trx*h*3 on the other hand, is characterized by its hydrophobic N-terminal domain and especially by the fact to appear

exclusively in monomeric form, even in absence of a reducing agent such as DTT (Cazalis et al, 2006).



```
      1                                                          60
  h3  MAAAATATTT AAATAAAVGP GEVISVHSLE QWTMQIEEAN AAKKLVVIDF TASWCGPCRI
  h2  MAASA      ATATAAAVGA GEVISVHSLE QWTMQIEEAN AAKKLVVIDF TASWCGPCRI
  h1  MAA              EE GAVIACHTKQ EFDTHMANGK ETGKLVIIDF TASWCGPCRV
coli  M                  SDKIIHLTDD SFDTDVLKAD GA---ILVDF WAEWCGPCKM

      61                                                        120
  h3  MAPIFADLAK KFPAAVFL-K VDVDELKPIA EQFSVEAMPT FLFMKEGDVK DRVVGAI-KE
  h2  MAPIFADLAK KFPAAVFL-K VDVDELKSIA EQFSVEAMPT FLFMKEGDVK DRVVGAI-KE
  h1  IAPVFAEYAK KFPGAIFL-K VDVDELKDVA EAYNVEAMPT FLFIKDGAKV DTVVGGR-KD
coli  IAPILDEIAD EYQGKLTVAK LNIDQNPGTA PKYGIRGIPT LLLFKNGEVA ATKVGALSKG

      121         135
  h3  ELTTKVGLHA AA
  h2  ELTNKVGLHA AQ
  h1  DIHTKIVALM GSASA
coli  QLKEFLDANL A
```

Fig.1: Overexpression and alignment of thioredoxins. (A) Gradient SDS-PAGE (4-20%) gels were loaded with the soluble fraction of E. coli BL21(DE3) transformed with the corresponding pET-Trxh construct and stained with Coomassie Brillant Blue R-250. His-tagged protein was purified by Ni-chelate affinity chromatography. Lane 2: Trx*h*3crude cell lysates; lane 2 to 4 eluates of the purified proteins of Trx*h*1, Trx*h*2, and Trx*h*3, respectively. Molecular markers (M) were loaded and their molecular mass in kD is indicated on the left. (B) Alignment of wheat and E. coli thioredoxins. The accession numbers are as follows: Trxh1, AY072771; Trxh2, AF286593; Trxh3, AF420472; E. coli, NP418228.

Protein fractions reduction

The stepwise reduction of protein fraction F1, made up albumins and globulins, is characterized by the variation in the molecular masses with the increase in the DTT concentration range. We observe the appearance of bands within molecular masses lower than 50 kD, which is concomitant with the disappearance of the higher molecular weight (fig. 2A). The fraction F2 is mainly represented by zeins groups, the most relevant prolamins in the maize storage proteins. α(alpha)-zein represents the most important member of this complex group, characterized by molecular masses of 19kD and 22 kD, which are alcohol-soluble.

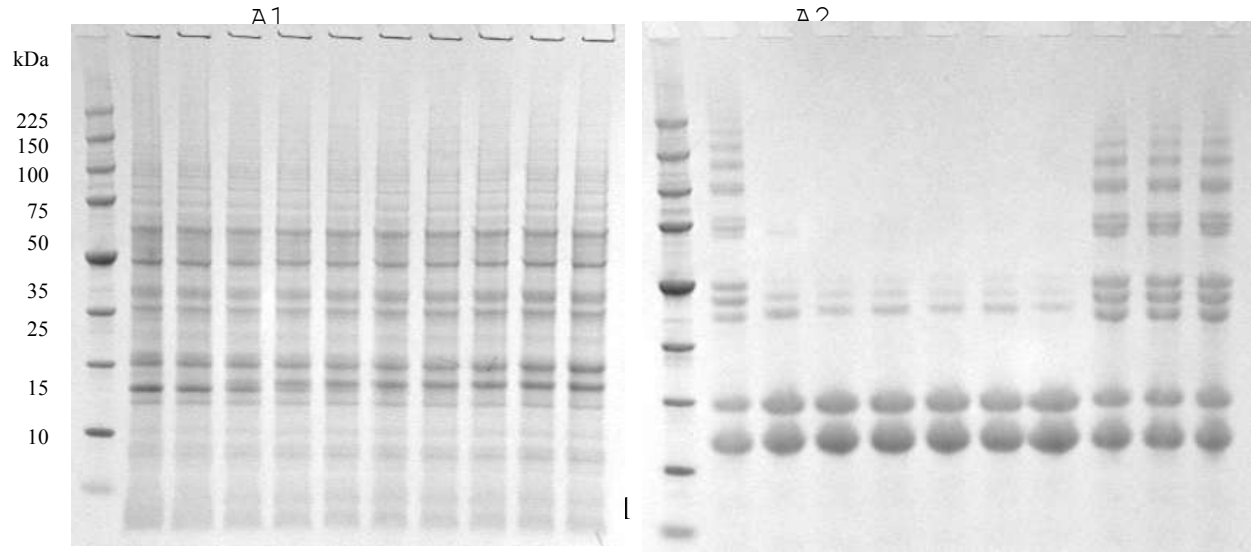


Fig.2: Protein fractions stepwise reduction. (A). Gradient SDS-PAGE (4-20%) analysis of protein samples from different stepwise reduction of soluble fraction F1 and alcohol-soluble fraction F2 (B). The DTT concentration range used was 0; 0.5; 2; 3; 4; 5; 10; 20 and 50 mM from lane 1 to 10 respectively. Molecular markers (M) were loaded and their molecular mass in kD is indicated on the left.

Zeins of β(beta) and δ (delta)-type, with a molecular mass of 14 kD and 10 kD respectively, are extracted in the presence of a reducing agent in alcoholic solution. A reducing agent is also required for extracting γ(gamma)-zein, with molecular masses of 16 and 27 kD.

The reduction of F2 fraction confirms available sulfhydryl groups linking polymeric proteins. This is able to highlight oligomerization events. Indeed, as the reducing agent concentration increases, we observe initially, an increase in the α(alpha)-zein fraction. At 10 mM of DTT, the concentration is enough to break particular molecular sulfur-sulfur bonds and a stochastic cross-link occurs among monomers giving place to high molecular weight polymers formation (Fig. 2B). This phenomenon simulates what could occur in dough by addition of reducing agent during kneading.

Thioredoxin– proteins interactions

Bromobimanes in solution react with small thiols and with reactive protein thiol groups to form the corresponding S-labelled products which are stable and suitable for qualitative and quantitative determination (Crawford et al., 1989). In this aim, maize endosperm proteins were extracted from full mature grain, labelled with mBBr and then subjected to SDS–PAGE. Qualitative analysis of sulfhydryl status shows either in F1 or in F2 that, in spite of the late storage mechanism during which, most proteins are oxidized, a

significant number of SH groups remain free (Fig. A2; B2), as it was observed with wheat endosperm proteins (Rhazi et al., 2003).

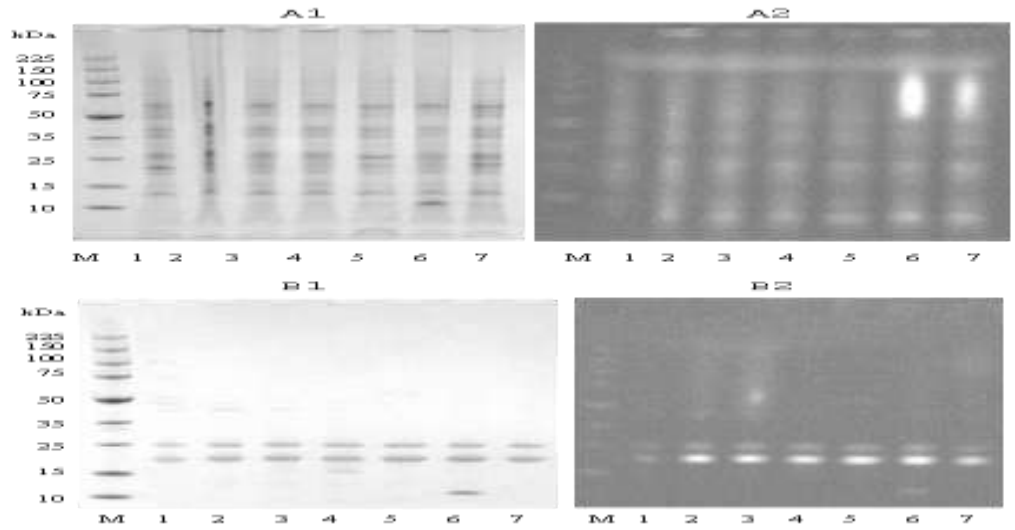


Fig. 3: Thioredoxin-linked reduction of endosperm protein fractions. (A) Soluble protein fraction F1 and (B) alcohol-soluble protein fraction F2. Following incubation with the indicated Trx, the protein fractions were derivatized with mBBr, and fluorescence was visualized after SDS-PAGE (4-20%) (A1, B1). Gels were then stained with Coomssie R250 (A2, B2). Lane 1: protein alone; lane 2: DTT reduced protein; lanes 3 to 6, interaction with Trx*h*2, *h*1, *h*3 and *E. coli* respectively; lane 7: fully reduced protein.

Trx interaction with the protein fractions underlines the two phenomena above mentioned, disulfide bridge reduction and network formation. With fraction F1, we observe that the greatest reducing capacity deals with E. coli Trx for which free thiol residues appear within the high molecular weights (Fig.3A1). The electrophoretic pattern generate by others Trx*h* shows the appearance of a banding, which underline a marked tendency to network formation with F1 proteins fraction (Fig. 3A2), as shown with mBBr fluorescence and Coomassie staining.

With fraction F2, one can underline the reducing action of Trx*h*2 by the appearance of the free sulfhydryl residues, especially between 50 and 75 kD, and characterized beyond by the fluorescent smear (Fig.3B), while this fluorescence of the fully reduced proteins sample appears for molecular masses higher than 75 kD. Trx*h*2 reduction capacity allows reformation of protein polymers of high molecular weigh as it occurred with the same fraction reduced by high DDT concentration (Fig. 2B). We note in a less extent the reducing activity of E. coli Trx on fraction F2 proteins. Trx*h*1 and Trx*h*3 for their part, generate a banding similar to what

it is found with stepwise reduction of the α-zeins fraction with a DTT concentration ranging from 1 to 5mM (Fig.2B).

It was shown, in addition to activate enzymes, to reduce intramolecular disulfide bonds of storage proteins of the starchy endosperm, leading them to proteolysis (Kobrehel et al., 1992; Lozalo et al.1996; Besse et al., 1997), Trx alters the structure of 'chloroform-methanol' like proteins of the albumin/globulin fraction of wheat endosperm so they become more soluble (Wong et al., 2004). On the basis of our results, we shows that the Trx*h* used in these experiments, interact differently according to the protein fractions. Furthermore, we confirm that the third cysteine residue of Trx*h1* confers cross-linking capacities. Analysis of pea Trx*h* isoforms expression exhibited divergent patterns and levels of accumulation, suggesting non redundant functions (Montrichard et al, 2003; Traverso et al, 2007). Our results contribute to the unravelling of the biological functions of these Trx*h* in seed and suggest that these functions are furthermore related to the protein microstructures differences. This kind of reaction can be made virtually with any Trx, including the chloroplast Trx *f* and *m*, yeast and animal. This Trx pool constitutes an incomparable tool in biotechnology because one can choose the precise factor needed or can build it from these data base resources.

CONCLUDING REMARKS

Trx have a great potential to improve food quality, for the developing countries as well as the developed ones where people is more and more sensitive to allergens and where hypoallergenic foods from cereals and legumes seeds are more than suitable. This potential is not only related to in vitro applications to modulate dough rheological characteristics for bread and bread-like made of wheat flour or non-glutenous flours such as maize, including from dicot such as pea. These proteins still have a great potential in transgenic plants generation, overexpressing specific Trx. Research programs in metabolisms regulation involving change in the redox state of thiol groups undertaken by many laboratories around the world, and especially on these redoxins (Buchanan and Balmer, 2005; Sahrawy, 2005) are in the point of reaching elegant applications in food and health fields.

LITERATURE CITED

Besse, I., Wong, J.H., Kobrehel, K. and Buchanan, B.B., 1997. Thiocalsin: a thioredoxin-linked substrate specific protease dependent on calcium *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 3169–3175.

Bestermann, A.; Vogt, K. and Follmann, H. 1983. Plant seeds contain several thioredoxins of regular size. Eur. *J. Biochem*. **131**, 339-344.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248–254.

Buchanan, B.B.; Schürmann P.; Decottignies, P. and Lozano, R.M. 1994. Thioredoxin: a multifonctional regulatory protein with a bright future in technology and medecine. *Arch. Biochem. Biophys*. **314**, 257-260.

Buchanan, B.B. and Yves Balmer, Y. 2005. Redox Regulation: A Broadening Horizon. *Annu. Rev. Plant Biol*. **56,**187–220.

Cazalis, R.; Pulido, P.; Aussenac, T.; Pérez-Ruiz, J. M.; and Cejudo, F. J., 2006. Cloning and characterization of three thioredoxin h isoforms from wheat showing differential expression in seeds. *J. Exp. Bot*. **57(10),** 2165-2172.

Cho , M-J, Wong J, Marx C, Jiang W, Lemaux P G, Buchanan B. B., 1999. Overexpression of thioredoxin h leads toenhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in germinating barley seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96,**14641-14646.

Cho, M-J; Wong, J. H.; Lemaux P. G. and Buchanan B.B., 2007. Transgenic plants with elevated thioredoxin levels, US Patent 7179964, FD (2002-07-12).

Crawford, N.A., Droux, M., Kosower, N.S., Buchanan, B.B., 1989. Evidence for function of the ferredoxin/thioredoxin systemin the reductive activation of target enzymes of isolated intact chloroplasts. *Archives Biochemistry Biohpysics* **271**, 223–239.

Gelhaye E, Rouhier N, Vlamis-Gardikas A, Girardet J-M, Sautie`re P-E, Sayzet M, Martin F, Jacquot J-P. 2003. Identification and characterization of a third thioredoxin h in poplar. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 629–635.

Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S, Hirano H, Mori S, Fijowara T, Hayashi H, Chino M. 1995. Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* **195**, 456–463.

Kobrehel, K., Wong, J.H., Balogh, A., Kiss, F., Yee, B.C. and Buchanan, B.B., 1992. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin *h*. *Plant Physiol.* **99**, 919–924.

Kobrehel, K.; Nimbona, C.; Buchanan, B.B.; Bergmann, J.; Wong, H. and Yee, B. C. 1994. Thioredoxin-linked reduction of wheat storage proteins. II. Technological consequences. *In* Gluten Proteins 1993. Association of Cereal Research, Detmold, pp.381-292.

Falk MC, Chassy BM, Harlander SK, Hoban TJ 4th, McGloughlin MN, Akhlaghi AR., 2002. Food biotechnology: benefits and concerns. *Nutrition Journal.* **132,** 1384-90.

Lindsay M. P. and Skerrit J. H., 1998. Examination of the structure of glutenin macropolymer in wheat flour and doughs by stepwise reduction, *J. Agric. Food Chem*. **46,** 3447-3457.

Lozano, R.M., Wong, J.H., Yee, B.C., Peters, A., Kobrehel, K. and Buchanan, B.B., 1996. New evidence for a role for thioredoxin *h* in germination and seedling development. *Planta* **200,** 100–106.

Mertz, E.T., Bates, L.S., and Nelson, O.E., 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm, *Science,* **145,** 279.

Montrichard F, Renard M, Alkhalfioui F, Duval FD, Macherel D, 2003. Identification and differential expression of two thioredoxin h isoforms in germinating seeds from pea. *Plant Physiology* **132,** 1707–1715.

Nelson, O.E., Mertz, E.T., and Bates, L.S., 1965. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins, *Science,* **150,** 1469.

Osborne, T.B. and Mendel, L.B., 1914. Amino acids in nutrition and growth, *J. Biol. Chem.,* **17,** 325.

Prasanna, B.M.; Vasal, S.K.; Kassahun, B. and Singh, N.N., 2001. Quality protein maize, *Current Science* **81(10),** 1308-1319.

L. Rhazi, L.; Cazalis, R.; Aussenac T. 2003. Sulfhydryl-disulfide changes in storage proteins of developing wheat grain: influence on the SDS-unextractable glutenin polymer formation. *Journal of Cereal Science* **38,** 3–13.

Sahrawy, M., 2005. A tribute to Julio Lopez-Gorge (1935–2004): the music in science. *Photosynthesis Research* **83,** 283–286.

Salamini, F. and Soave, C., in *Maize for Biological Research* (ed. Sheridan, W. F.), University of North Dakota Press, 1982, pp. 155–160.

Stein M, Jacquot JP, Jeannette E, Decottignies P, Hodges M, Lancelin JM, Mittard V, Schmitter JM, Miginiac-Maslow M. 1995. Thioredoxin: structure of the genes coding

for the chloroplastic m and cytosolic h isoforms: expression in Escherichia coli of the recombinant proteins, purification and biochemical properties. *Plant Molecular Biology* **28**, 487–503.

Traverso, J.A.; Vignols, F., Cazalis, R.; Pulido, A.; Sahrawy, M.; Cejudo, F. J.; Meyer, Y. and Chueca, A., 2007. PsTRXh1 and PsTRXh2 Are Both Pea h-Type Thioredoxins with Antagonistic Behavior in Redox Imbalances. *Plant Physiology*, **143**, 300–311.

Vassal, S. K., 2000. Quality Protein Maize Story, Food *Nutr. Bull* **21,**445-450.

Watson, S. A., in *Corn: Chemistry and Technology* (eds Watson, S. A. and Ramstad, P. T.), Am. Assoc. Cereal Chemists, St. Paul, MN, 1987, pp. 53–82.

Wong, J. H. Kim, Y-B.; Ren, P-H.; Cai, N., Cho, M.J.; Hedden, P.; Lemaux, P.G. and. Buchanan, B.B., 2002. Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone *PNAS* **99,** 16325-16330.

Wong J.H.; Cai N., Charlene K. Tanaka, C.K., Vensel, W.H., HurkmanW. J., and Buchanan, B.B., 2004. Thioredoxin Reduction Alters the Solubility of Proteins of Wheat Starchy Endosperm: An Early Event in Cereal Germination *Plant Cell Physiol.* **45(4),** 407–415.

Partie VI

Références bibliographiques

Acevedo, A., Paleo, A. D et Federico, M.L. 2001. Catalase defeciency reduces survival and pleiotropically affects agronomic performance in field-grown barley progeny. *Plant Science*. 160: 847-855.

Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K et Mukherjee, S.K. 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67: 657-685.

Alkhalfioui F., Renard M., Frendo P., Keichinger, C., Meyer, Y., Gelhaye E., et al. 2008. A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiology*. 148: 424-435.

Alkhalfioui, F., Renard, M., Vensel, W.H., Wong, J., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Buchanan, B.B et Montrichard, F. 2007. Thioredoxin- linked proteins are reduced during germination of Medicago truncatula seeds. *Plant Physiology*. 144: 1559-1579.

Allen, R.D., Webb, R.P et Schke, S.A. 1997. Use of transgenic plants to study antioxidant defense. *Free Radical Biology & Medicine*. 23: 473-479.

Alsher, R.G. 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiologia Plantarum*. 77: 457-464.

Apel, K et Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology*. 55: 373-399.

Arner, E.S.J et Holmgren, A. 2002. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*. 267: 6102-6109.

Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 601-639.

Ashtamker, C., Kiss, V., Sagi, M., Davydov, O et Fluhr, R. 2007. Diverse sucellular localitions of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology*. 143: 1817-1826.

Aslund, F., Berndt, K.D et Holmgren, A. 1997. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein- protein redox equilibria. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 30780-30786.

Baier M et Dietz K.J. 1997. The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant Journal*. 12:179-190.

Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*. 14: 93-107.

Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P et Buchanan, B.B. 2003. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. 100: 370-375.

Balmer, Y., Koller, A., Del Val, G., Schürmann, P et Buchanan, B.B. 2004. Proteomics uncovers proteins interacting electrostatically with thioredoxin in chloroplasts. *Photosynthesis Research*. 79: 275-280.

Balmer, Y., Vensel, W.H., Cai, N., Manieri, W., Schürmann, P., Hurkman, W.J et Buchanan, B.B. 2006a. A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA* 103: 2988-2993.

Balmer, Y., Vensel, W.H., Dupont, F. M., Buchanan, B.B et Hurkman, W.J. 2006b. Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1591-1602.

Barajas-López, J.D., Serrato, A.J. Olmedilla, A., Chueca, A et Sahrawy, M. 2007. Localization in roots and flowers of pea chloroplastic thioredoxin f and thioredoxin m proteins reveals new roles in nonphotosynthetic organs. *Plant Physiology*. 145: 946-960.

Bartels, D. et Salamini, F. 2001. Desiccation tolerance in the resurrection plant Craterostigma plantagineum. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology.* 127: 1346-1353.

Bashandy, T., Guilleminot, J., Vernoux, T., Caparros-Ruiz, D., Ljung, K., Meyer, Y. ? et Reichheld, J.P. 2010. Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in Arabidopsis auxin signaling. *Plant Cell*. (Epub ahead of print) PMID: 20164444.

Battais, F., Pineau, F., Popineau, Y., Aparicio, C., Kanny, G., Guerin, L., Moneret-Vautrin, D. A et Denery-Papini, S. 2003. Food allergy to wheat: Identification of immunoglobulin E and immunoglobulin Gbinding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clinical & Experimental Allergy*. 33: 962-970.

Beggren, M. I., Husbeck, B., Samulitis, B., Baker, A. F., Gallegos, A et Powis, G. 2001. Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide

but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Archives of Biochemistry & Biophysics*. 392: 103-109.

Berndt, C., Lillig, C.H et Holmgren, A. 2008. Thioredoxins and glutarédoxines as facilitators of protein folding. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1783: 641-650.

Besse, I., Wong, J. H., Kobrehel, K., and Buchanan, B. B. 1996. Thiocalsin: A thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. *Proceeding of The National. Academy of Science. USA*. 93:3169-3175.

Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 6: 1055-1066.

Bonhoff, A et Grisebach, H. 1988. Elicitor-induced accumulation of glyceollin and callose in soybean roots and localized resistance against Phytophthora megasperma f.sp. glycinea. *Plant Science*. 54: 203-209.

Bowler, C., Van Montagu M et Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43:83-116.

Bréhelin, C., Meyer, E.H., de souris, J.P., Bonnard, G et Meyer, Y. 2003. Ressemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins: similar séquences of divergent gene expression, protein localization, and activity. *Plant Physiology*. 132: 2045-2057.

Buchanan, B.B et Balmer, Y. 2005. Redox regulation: A broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology*. 56:187-220.

Buchanan, B.B et Frick, O. L. 2007. Thioredoxin and food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 119: 513-514.

Buchanan, B.B et Wolosiuk. 1976. Photosynthetic regulatory protein found in animal and bacterial cells. *Nature*. 264: 669-670.

Buchanan, B.B. 1991. Regulation of CO2 assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin in system. Perspective on its discovery, present status, and future development. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 288: 1-9.

Buchanan, B.B., Adamidi, C., Lozano, R.M., Yee, B. C., Momma, M., Kobrehel, K., Ermel, R et Frick, O.L. 1997. Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. USA 94: 5372-5377.

Buchanan, B.B., Kalberer, P.P et Arnon, D.I. 1967. Ferredoxin-activated fructose diphosphatase in isolated chloroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 29: 74-79.

Buchanan, B.B., Schurmann, P., Wolosiuk, R.A et Jacquot, J.P. 2002. The ferredox/thioredoxin system: form discovery to molecular structures and beyond. *Photosynthesis Research*. 73: 215-222.

Bunce, N., White, R.P et Shewery, P.R. 1985. Variation in estimation of the molecular weights of cereal prolamin by SDS-PAGE. *Journal of Cereal Sciences*. 3: 131-142.

Capitani, G., Markovi-Housley, Z., DelVal, G., Morris, M., Jansonius, J. N., and Schürmann, P. 2000. Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*. 302:135-154.

Cazalis, R., Pulido, P., Aussenac, T., Pérez-Ruiz, J.M et Cejudo, F.J. 2006. Cloning and characterization of three thioredoxin h isoformes from wheat showing differential expression in seeds. *Journal of Experimental Botany*.57: 2165-2172.

Cejudo, F.J., Dominguez, F et Moreno, J. 2004. A gibberellin-induced nuclease is localized in the nucleus of wheat aleurone cells undergoing programmed cell death. *The Journal of biological Chemistry*. 279: 11530-11536.

Chai, Y.C., Ashraf, S.S., Rokutan, K., Johnston, R.B et Thomas, J.A. 1994. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 310:273-281.

Cho, M.J, Wong, J.H., Marx, C., Jiang, W., Lemaux, P.G et Buchanan, B.B. 1999. Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA* 96: 14641-14646.

Choi, H.J., Kang, S.W., Yang, C.H., Rhee, S.G. et Ryu, S.E. 1998 Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 A resolution. *Nature Structural Biology*. 5: 400-406.

Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Dietz, K.J et Issakidis-Bourguet, E. 2004. Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new y-type. *Plant Physiology*. 136: 4088-4095.

Collinson, E.J., Wheeler, G.L., Garrido, E.O., Avery, A.M., Avery, S.V et Grant, C.M. 2002. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *Journal of Biological Chemistry*. 277:16712-16717.

Collinson, EJ et Grant, C.M. 2003. Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 22492-22497.

Collvile, L et Smirnoff, N. 2008. Antioxidant status, peroxidase activity, and PR protein transcript levels in ascorbate-deficient Arabidopsis thaliana vtc mutants. *Journal of Exprimental Botan*y. 59: 1-12.

Dat, J.F., Pellinen, R., Beeckman, T., Van De Cotte, B., Langebartels, C., Kangasjarvi, J., Inze, D et Van Breusegem, F. 2003. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant Journal*. 33: 621-632.

Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D et al. 2003. The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *The Plant Cell*.15: 2181-91.

Dietz, K.J. 2003. Plant peroxiredoxins. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 93-107.

Droux, M., Jacquot, J.P., Miginiac-Maslow, M., Gadal, P., Huet, J.A., Crawford, N.A., Yee, B.C et Buchanan, B.B. 1987a. Ferredoxin-thioredoxin reductase, an iron-sulfur enzyme linking light to enzyme regulation in oxygenic photosynthesis: purification and properties of the enzyme from C3, C4, and cyanobacterial species. *Archives of Biochemistry and Biophysices*. 252: 426-439.

Droux, M., Miginiac-Malsow, M., Jacquot, J.P., Gadal, P., Crawford, N.A., Kosower, N.S et Buchanan, B.B. 1987b. Ferredoxin-thioredoxin reductase: a catalytically active dithiol group links photoreduced ferredoxin to thioredoxin functional in photosynthetic enzyme regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 256: 426-439.

Du., Y.Y., Wang, P.P., Chen, J et Song, S.P. 2008. Comprehensive functional analysis of the Catalase gene Family in Arabidopsis thaliana. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50: 1318-1326.

Dunoyer P., Schott G., Himber C., Meyer D., Takeda A., Carrington J.C. and Voinnet O**.** 2010. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, 328:912-916.

Edreva, A, M. 1990. Induction of "pathogenesis-related" proteins in tobacco leaves physicological (non-pathogenic) disorders. *Journal of Experimental Botany*. 41: 701-703.

Edreva, A, M. 1991. Stress proteins of plants-PR (b)-proteins. *Soviet Plant Physiology*. 38: 579-588.

Edreva, A. M, Blancard, D., Delon, R., Bonnet, P et Ricci, P. 2002. Biochemical changes in ?-cryptogein-elecited tobacco: a possible basis of acquired resistance. *Beiter Tabakforsch Intranat*. 20: 53-59.

Esfandiari, E., Shakiba, M. R., Mahboob, S.A., Alyari, H et Shahabivand. 2008. The effect of water stress on the antioxidant content, protective enzyme activities, praline content and lipid peroxidation in wheat seeling. *Pakistan Journal of biological Sciences*. 11: 1916-1922.

Finkemeir, I., Goodman, M., Lamkemyer, P., Kardlbinder, A., Sweetlove, L.J et Dietz, K.J. 2005. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of Arabidopsis thaliana under stress. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 12168-12180.

Florencio, F. J., Yee, B. C., Johnson, T. C., et Buchanan, B. B. 1988. An NADP/thioredoxin system in leaves: Purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin h from spinach. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 266:496-507.

Foyer, CH et Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*. 17: 1866-75.

Gao, Z., Xie, X., Ling, Y., Muthukrishnan, S et Liang, G.H. 2005. Agrobacterium tumefaciens mediated sorghum transformation using a mannose selection system. *Plant Biotechnology Journal*. 3: 591-599.

Gate, P. 2007. Les solutions de demain. *Perspectives Agricole.* 336, 19-31.

Gautier, M.F., Lullien-Pellerin, V., de Lamotte-Guéry, F., Guirao, A et Joudrier, P. 1998. Characterization of wheat thioredoxin h cDNA and production of an active Triticum aestivum protein in Escherichia coli. *European Journal of Biochemistry*. 252:314-324.

Gelhaye, E., Rouhier, N et Jacquot, J.P. 2003. Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS Letters*. 555: 443-448.

Gelhaye, E., Rouhier, N et Jacquot, J.P. 2004a. The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 265-271.

Gelhaye, E., Rouhier, N., Gérard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P.I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y et Jacquot, J.P. 2004b. A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and

regulates the alternative oxidase. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. USA 101: 14545-14550.

Goedeke, S., Hensel, G., Kapusi, E., Gahrtz, M.J et Kumlehn, J. 2007. Transgenic Barley in Fundamental research and biotechnology. *Trans Plant Journal*. 1: 104-117.

Gold-mark, P.J., Curry, J., Morris, C.F et Walker-Simmons, M.K. 1992. Cloning and expression of an embryo-specific mRNA up-regulated in hydrated dormant seeds. *Plant Moleculare Biology*. 19: 433-441.

Goyer, A., Haslekas, C., Miginiac-Maslow, M., Klein, U., Le Mare-chal, P., Jacquot, J.P et Decottignies, P. 2002. Isolation and characterization of a thioredoxin-dependent peroxidase from Chlamydomonas reinhardtii. *European Journal of Biochemistry*. 269:272-282.

Guan, L.M et Scandalions, J.G. 2000a. Hydrogen peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free Radical Biology & Medicine*. 28: 1182-1190.

Guan, L.M et Scandalions, J.G. 2000b. Catalase transcript accumulation in response to dehydration and osmotic stress in leaves of maize viviparous mutants. *Redox Report*. 5: 377-383.

Guo, H.X., Yin, J., Ren, J.P., Wang, Z.Y et Chen, H.L. 2007. Changes in proteins within germinating seeds of transgenic wheat with an antisense construct directed against the thioredoxin. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*. 33: 18-24.

Hagio, T. 2002. Adventitious shoot regeneration from immature embryos of sorghum. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 68:65-72.

Halliwell, B et Gutteridge. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymlogy*. 186: 1-85.

Hammond, S.M., Berstein, E., Beach, De et Hannon, G.J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature*. 404: 293-296.

Hannon, G.J. 2002. RNA interférence. *Nature*. 418: 244-251.

Hartman, H., Syvanen, M et Buchanan, B.B. 1990. Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxins f and m. *Molecular Biology and Evolution*. 7: 247-254.

Haslekas, C., Stacy, R.A., Nygaad, V., Culianez,-Macia, F. A et Aelen R.B. 1998. The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, AtPer1, in Arabidopsis thaliana is seed-specific and related to dormancy. *Plant Molecular Biology*. 36: 833-845.

Haslekas, C., Viken, M.K., Grini, P.E., Nygaad, S.H., Meza, T.J et Aelen, R.B. 2003. Seed 1-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. *Plant physiology*. 133: 1148-1157.

Heidari, M et Mesri, F. 2008. Salinity effects on compatible solutes, antioxidant enzymes and ion content in three wheat cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 11: 1385-1389.

Henmi, K., Tsuboi, S., Demura, T., Fukuda, H., Iwabuchi, M et Ogawa, K.I. 2001. A possible role of glutathione and glutathione disulfide in tracheary element differentiation in the cultured mesophyll cells of Zinnia elegans. *Plant Cell Physiology*. 42: 673-676.

Himmelbach, A., Zierold, U., Hensel, G., Riechen, J., Douchlov, D., Schweizer, P et Kumlehun, J. 2007. A set modular binary vector for transformation of cereals 1[W][OA]. *Breakthrough Technologies*. 145: 1192-1200.

Hiroko, K.T., Chihiro, K., Kyoko, O., Kentaro, M., Kazuhiro, K., Takeshi, K et Masamitsu W. 2004. DNA Interference: a Simple and Efficient Gene-Silencing System for High-Throughput Functional Analysis in the Fern Adiantum. *Plant and Cell Physiology*. 11: 1648-1657.

Hirota, K., Nakamura, H., Masutani, H et Yodoi, J. 2002. Thioredoxins Superfamily and Thioredoxin-Inducing Agents. *Alcohol and wine in health and disease*. 957: 189-199.

Hirotak, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K et Yodoi, J. 1997. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proceedings of the National Acadamy of sciences. USA*. 94: 3633-363.

Hisabori, T., Hara, S., Yamazaki, D., Hosoya-Matsuda, N et Motohashi, K. 2005. Thioredoxin affinity chromatography: a useful method for further understanding the thioredoxin network. *Journal of Experimental Botany*. 56: 1463-1468.

Hogg, P.J. 2003 Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochemistry Science*. 28: 210-214.

Holmgren, A. 1979. Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *The Journal of Biological Chemistry*. 254: 9113-9119.

Holmgren, A., Söderberg, B. O., Eklund, H et Bränden, C. I. 1975. Three dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S2 to 2.8 Angström resolution. *Proceeding of the National Academy of Sciences. U S A.* 72: 2305-2309.

Ishiwatari, Y., Fijiwara, T., McFarland, K.C., Nemoto, K., Hayashi, H,. Chino, M et Lucas, W.J. 1998. Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta*. 205: 12-22.

Jacquot, J.P, Lopez-Jaramillo, J, Miginiac-Maslow, M, Lemaire, S, Cherfils, J, Chueca, A et Lopez-Gorge, J. 1997. Cysteine-153 is required for redox regulation of pea chloproplast fructose-1,6-biphosphatase. *FEBS Letters*. 401: 143-147.

Jacquot, J.P., Rivera-Madrid, R., Marinho, P., Kollarova, M., Le Maréchal, P., Miginiac Maslow, M et Meyer, Y. 1994. Arabidopsis thaliana NADPH thioredoxin reductase. cDNA characterization and expression of the recombinant protein in Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology*. 235: 1357-1363.

Jacquot, J.P., Vidal, J., Gadal, P et Schürmann, P.1978. Evidence for the existence of several enzyme-specific thioredoxins in plants. *FEBS Letters*. 94: 243-246.

Jeng, M. F., Campbell, A. P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D. A., Wright, P. E., and Dyson, H. J. 1994. High-resolution solution structures of oxidized and reduced Escherichia coli thioredoxin. *Structure.* 2:853-868.

Jeoung, J.M., Krishnaveni, S., Jayaraj, J., Haying, Y., Trick, H.N., Muthukrishna, S et Liang, G.H. 2004. Agrobacterium-mediated transformation of grain sorghum. In: Seetharama N, GodwinI (eds) Sorghum tissue culture and transformation. *Science Publishers*. 57-64.

Jiao, J., Yee, B.C., Wong, J.H., Kobrehel, K et Buchanan, B.B. 1993. Thioredoxin-linked changes in regulatory properties of barley ?-amylase/subtilisn inhibitor protein. *Plant physiology and Biochemistry*. 31: 799-804.

Jimenez, A., Hernandez, J.A., Pastori, G., Del Rio., L.A et Sevilla, F. 1998. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondrie and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology*. 118: 1327-1335.

Job, C., Rajjou, L., Lovigny, Y., Belghazi, M., et Job, D. 2005. Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. *Plant Physiology*. 138: 790-802.

Jones, H.D. 2005. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Sciences*. 41: 137-147.

Joubert J.M., Yvin J.C., Barchietto T., Seng J.M., Plesse B., Klarzynski O., Kopp M., Fritig B et Kloareg B. 1998. A ß-1,3 glucan, specific to a marine alga, stimulates plant defence reactions and induces broad range resistance against pathogens, in: British Crop

Protection Council (Ed.), *The 1998 Brighton Conference : Pests and Diseases*, vol. 2, Farnam. pp. 441-448.

Juarez-Diaz, J.A., McClure, B., Vazquez-Santana, S., Guevara-Garcia, A., Leon-Mejia, P., Marquez-Guzman, J et Cruz-Garcia, F. 2006. A novel thioredoxin h is secreted in Nicotiana alata and reduces S-RNase in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 3418-3424.

Juttner, J., Olde, D., Langridge, P et Baumann, U. 2000. Cloning and expression of a distinct subclass of plant thioredoxins. *European Joural of Biochemistry*. 267: 7109-7117.

Kawai-Toyooka, H., Kuramoto, C., Orui, K., Motoyama, K., Kikuchi, K., Kanegae, T et Wada, T. 2004. DNA Interference: a Simple and Efficient Gene-Silencing System for High-Throughput Functional Analysis in the Fern Adiantum. *Plant and Cell Physiology*. 45: 1648-1657.

Kehr, J et Buhtz, A. 2008. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of Experimental Botany*. 58: 85-92.

Khsravinejad, F., Heydari, R et Farboodnia, T., 2008. Antioxidant responses of two barley varieties to saline stress. *Pakistan Journal of Biological*. 11: 905-909.

Kim, S.H et Hamada, T. 2005. Rapid and reliable method of extracting DNA and RNA from sweetpension, Ipomoea batatas (L.) Lama . *Biotechnology Letters*. 27: 1841-1845.

Kim, S.Y., Lim, J.H., Park, M. R., Kim, Y.J., Park, T.I., Seo, Y.W., Choi, K.G et Yun, S.J. 2005. Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 218-224.

Klarzynski, O et Fritig, B. 2001. Stimulation des défenses naturelles des plantes. *C.R. Acad.Sci. Paris, Sciences de la vie/ Life Scienc*es. 324: 953-963.

Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J., Yvin, J., Kopp, M., Kloareg, B et Fritig, B. 2000. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defenses in tobacco. *Plant Physiology*. 124: 1027-1038.

Klughammer, B., Baier, M et Dietz, K.J. 1998. Inactivation by gene disruption of 2-cysteine-peroxiredoxin in Synechocystis sp. PCC 6803 leads to increased stress sensitivity. *Plant Physiology*. 104: 30451-30458.

Kobrehel, K., Wong, J.H., Balogh, A., Kiss, F., Yee, B.C et Buchanan, B.B. 1992. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiology*. 99: 919-924.

Kohler, P., Belitz, H.D et Wierser, H. 1993. Disulphide bonds in wheat gluten: further cystine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular (LMW) subunits of glutenin and from β-gliadins. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung and-Forschung*. 196: 239-247.

Konig, J., Baier, M., Horling, F., Kahmann, U., Harris, G., Schurmann, P et Dietz, K.J. 2002. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierachy of photosynthetic electron flux. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. 99: 5738-5743.

Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., Rhee, S.G et Nett, L.E. 2000. Catalase and thioredoxin peroxidase protect Saccharomyces cerevisiae against Ca (2+)-induced mithochondrial membrane permeabilization and cell death. *FEBS Letters*. 473: 177-182.

Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E et Corbett, A.H. 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin?. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 5101-5105.

Larkindale, J., Hall, J.D., Knight, M.R et Vierling, E. 2005. Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology*. 138: 882-897.

Lee, J.W et MacRitchie, F. 1971. The effect of gluten protin fractions on dough properties. *Cereal Chemistry*. 48: 620-625.

Lee, K.O., Jang, H.H., Jung, B.G., Chi, Y.H., Lee, J.Y., Choi, Y.O., Lee, J.R., Lim, C.O., Cho, M.J et Lee, S.Y. 2000. Rice 1Cys-peroxiredoxin over-expressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enchances antioxydant activity. *FEBS Letters*. 486: 103-106.

Lee, S.H., Ahsan, N., Lee, K.W., Kim, D.H., Lee, D.G., Kwak, S.S., Kwon, S.Y., Kim, T.H et Lee, B.H. 2009. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase intransgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*.164: 1626-1638.

Lemaire, S., Collin, V., Keryer, E Issadikis-Bourguet, E., Lavergne, D et Miginiac-Maslow, M. 2003b. Chlamydomonas reinhardtti: a model organism for the study of the thioredoxin family. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41: 513-52.

Lemaire, S., Guillon, B., Le Marechal, P., Keryer, E., Miginiac- Maslow, M et Decottignies, P. 2004. New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote Chlamydomonas reinhardtii. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA* 101: 7475-7480.

Lemaire, S.D., Collin, V., Keryer, E., Quesada, A.L et Miginiac- Maslow, M. 2003b Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of Chlamydomonas reinhardtii. *FEBS Letters*. 543: 87-92.

Lemaire, S.D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., and Issakidis- Bourguet, E. 2007. Thioredoxins in chloroplasts. *Current Genetics*. 51: 343-365.

Liu, L., Yin, J., Ren, J.P et Han, J.F. 2004. Effects of antisense trxs on germination of transgenic wheat seeds. *Acta Agronomica Sinica*. 30: 801-805.

Livak, K.J et Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative and the 2T- C method. *Methods*. 25: 402-408.

Lozano, R.M., Wong, J.H., Yee, B.C., Peters, A., Kobrehel, K et Buchanan, B.B. 1996. New evidence for a role for thioredoxin h in germination and seedling development. *Planta*. 200: 100-106.

Lu, Z.X., Gaudet, D. A., Frick, M., Puchalski, B., Genswin, B et Laorche, A. 2005. Identification and characterization og genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with Tilletia tritici, the common bunt pathogen. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 420-431.

Lucas, W.J., Ding, B et Vanderschoot, C. 1993. Tansley review. No. 58 plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytologist*. 125: 435-476.

MacRitchie, F. 1980. Studies of gluten proteins from wheat flours. *AACC Cereal Food world*. 25: 382-385.

Maeda, K., Finnie, C et Svensson, B. 2004. Cy5 maleimide labelling for sensitive detection of free thiols in native protein extracts: Identification of seed proteins targeted by barley thioredoxin h isoforms. *Biochemical Journal*. 378: 497-507.

Maeda, K., Finnie, C et Svensson, B. 2005. Identification of thioredoxin h reducible disulphides in proteomes by differential labelling ofcysteines: Insight into recognition and regulation of proteins in barley seeds by thioredoxin h. *Proteomics*. 5:1634-1644.

Maeda, K., Finnie, C., Ostergaard, O et Svensson, B. 2003. Identification, cloning and characterization of two thioredoxin h isoforms, HvTrx h1 and HvTrx h2, from barley seed proteome. *European Journal of Biochemistry*. 270: 2633-2643.

Marx, C., Wong, J.H et Buchanan, B.B. 2003. Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. *Planta*. 216: 454-460.

Matsumoto, K., Masutani, H., Nishiyama, A., Hashimoto, S., Gon, Y., Horie, T et Yodoi, J. 2002. C-propeptide region of human pro alpha 1 type 1 collagen interacts with thioredoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 295: 663-667.

McMowat, A. 2003. Coeliac disease 6-A meeting point for genetics, immunology and protein chemistry. *Lancet*. 361: 1290-1292.

Ménard R., Alban S., de Ruffray P., Jamois F., Franz G., Fritig B., Yvin J.C. and Kauffmann S. 2004. b-1 3 glucan sulfate but not b-1 3 glucan induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and Arabidopsis. *Plant Cell*. 16:3020-3032.

Meng, L., Wong, J.H., Feldman, L.J, Lemoux, P.G., et Buchanan, B.B. 2010. A membrane-associated thiorédoxine required for plant growth moves from cell to cell, suggestive pf a role in intercellular communication. *Procedding of the National Academy of Sciences*. 107: 3900-3905.

Meyer, A.J. 2007. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of Plant Physiology*. doi:10.1016/j.jplph.2007.10.015.

Meyer, Y., Reichheld, J.P et Vignols, F. 2005. Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynthesis Research*. 86: 419-433.

Meyer, Y., Riondet, C., Constans, L., Abdelgawwad, M.R., Reichheld, J.P et Vignols, F. 2006. Evolution of redoxin genes in the green lineage. *Photosynthesis Research*. 89:179-192.

Meyer, Y., Vignols, F et Reichheld, J.P. 2002. Classification of plant thioredoxins by séquence similarity and intron position. *Methods in Enzymology*. 347: 394-402.

Meyer, Y., Siala, W., Bashandy, T., Riondet, C., Vignols, F et Reichheld, J.P. 2008. Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1783: 589-600.

Michelet, L., Zaffagnini, M., Marchand, C., Collin, V., Decottignies, P., Tsan, P., Lancelin, J.M., Trost, P., Miginiac-Maslow, M., Noctor, G et Lemaire, S.D. 2005.

Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proceeding of The National Academy of Science. USA*. 102: 16478-16483.

Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Keryer, E., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E et Lemaire, S.D. 2006. Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: New crosstalks to explore. *Photosynthesis Research*. 89: 225-245.

Miki, D., Itoh, R et Shimamoto, K. 1995. RNA Silencing of Single and Multiple Members in a Gene Family of Rice. *Plant Physiology*. 138: 1903-1913.

Mittler, R et Zilinskas, B.A. 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*. 212: 540-546.

Montrichard, F., Renard, M., Alkhalfioui, F., Duval, F.D et Macherel, D. 2003 Identification and differential expression of two thioredoxin h isoforms in germinating seeds from pea. *Plant Physiology*. 132 : 1707-1715.

Morita, E., Matsuo, H., Mihara, S., Morimoto, K., Savage, A.W.J et Tatham, A.S. 2003. Fast β-gliadin is a major allergen in wheatdependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Dermatological Sciences*. 33: 99-104.

Mosiniak, M., Prat, R et Roland, J.C. 2006. Du blé de pain, chapitre : le blé. *B media*.

Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T et Hisabori, T. 2001. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proceeding of the National Academy of Scienes. USA*. 98: 11224-11229.

Mou, Z., Fan, W et Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*. 113: 935- 44.

Mouaheb, N., Thomas, D., Verdoucq, L., Monfort, P et Meyer, Y. 1998. In vivo functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. 95: 3312-3317.

Mowla, S.B., Thomson, J.A., Farrant, J.M et Mundree, S.G. 2002. A nouvel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the ressurection plant Xerophyta viscosa Baker. *Planta*. 215: 716-726.

Muller, E.G. 1991. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 9194-9202.

Muller, S et Wieser, H. 1995. The location of disulphide bonds in ?-type gliadins. *Journal of Cereal Science*. 22: 17-21.

Münch-Garthoff, S., Nuhaus, J. M., Boller, T., Kemmerling, B et Kogel, K. H. 1997. Expression of β-1,3-glucanase and chitinase in healthy, stem-rust-affected and elicitor-treated rearisogenic wheat lines showing Sr5- or Sr25-specified race-specific rust resistance. *Planta*. 201: 235-244.

Mustacich, D et Powis, G. 2000. Thioredoxin reductase. *Biochemistry Journal*. 806. 346:1-8.

Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D.B., Issakidis, E., Jacquot, J.P et Rouhier, N. 2006a. Plant glutathione peroxidase are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*. 142: 1364-1379.

Navrot, N., Gelhaye, E., Jacout, J.P et Rouhier, N. 2006b. Identification of a new family of plant proteins loosely related to glutarédoxines with four CxxC motives. *Photosynthesis Research*. 89: 71-79.

Nemoto, Y., Yamamato, T., Takada, S., Matsui, Y et Obinata, M. 1990. Antisens RNA of the latent period gene (MER5) inhbits the differntiation of murine erthroleukemia Cells. *Gene*. 91: 261-265.

Nguyen, T.V., Thu, T.T., Claeys, M., Angenon, G. 2007. Agrobacterium-mediated transformationof sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench) using an improved in vitro regenerationsystem. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 91: 155-164.

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: 249-279.

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H et Foyer, CH. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany*. 53:1283-304.

Nowak, M., Woszko, E., Fedoruk-Wyszomirska, A., Pospieszny, H., Barciszewska, M.Z et Barciszewski, J. 2009. A new and efficient method for inhibition of RNA viruses by DNA interference. *FEBS Journal*. 276: 4372-4380.

Noguera-Mazon, V., Krimm, I., Walker, O et Lancelin, J.M. 2006. Protein-protein interactions within peroxiredoxin systems. *Photosynthesis Research*. 89: 277-290.

Nuruzzaman, M., Gupta, M., Zhang, C., Wang, L., Xie, W., Xiong, L., Zhang, Q et Lian, X. 2008. Séquence and expression analysis of the thioredoxin protein gene family in rice. *Molecular Genetics and Genomics*. 280: 139-151.

Ogawa K, Tasaka Y, Mino M, Tanaka Y, Iwabuchi M (2001) Association of glutathione with flowering in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiology*. 42: 524-530.

Ogawa, K., Hatano-Iwasaki, A., Yanagida, M et Iwabuchi, M. 2004. Level of glutathione is regulated by ATP-dependent ligation of glutamate and cysteine through photosynthesis in Arabidopsis thaliana: mechanism of strong interaction of light intensity with flowering. *Plant Cell Physiology*. 45:1-8.

Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, Y., Farrant, J.M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., Job, D., Corbineau., F et Bailly, C. 2007. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant Journal*. 50: 452-465.

Pääkkönen, E., Seppänen, S., T. Holopainen, T., Kokko, H., Kärenlampi, S., Kärenlampi, L et Kangasjärvi, J. 1998. Induction of genes for the stress proteins PR-10 and PAL in relation to growth, visible injuries and stomatal conductance in birch (Betula pendula) clones exposed to ozone and/or drought. *New Phytologist*.138: 295-305.

Pagano, E. A., Chueca, A et Lopez-Gorge, J. 2000. Expression of thioredoxins f and m, and of their targets fructose-1,6-bisphosphatase and NADP-malate dehydrogenase, in pea plants grown under normal and light/temperature stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1299 1307.

Palauqui, JC et Balzergue S. 1999. Activation of systemic acquired silencing by localised introduction of DNA. *Current Biology*. 9: 59-66.

Palosuo, K., Varionen, E., Kekki, O. M., Klemol, T., Kalkkinen, N., Alenius, H et Reunala, T. 2001. Wheat β-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 108: 634-638.

Park, J.B et Levine, M. 1996. Purification, cloning and expression of dehydroascorbic acid-reducing activity from human neutrophils: identification as glutaredoxin. *Biochemistry Journal*. 315 : 931-938.

Pierpoint, W.S., Robinson, N.P et Leason, M. B. 1981. The pathogenesis-related proteins of tobacco: their induction by viruses in intact plants and their induction by chemicals in detached leaves. *Physiological Plant Pathology*. 19: 85-97.

Price, A et Hendry, G. 1997. The signification of the tocopherols in stress survival in plant. In: Evans CR (ed) Free Radicals, Oxidant Stress and Drug Action. *Richelieu Press, London*, pp. 443-450.

Prosperi, M. T., Ferbus, D., Karczinski, I et Goubin, G. 1993. A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial protéines. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 11050-11056.

Pulido, P., Cazalis, R et Francisco, J.C. 2009. An antioxydant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. *The plant journal*. 57: 132-145.

Quimby, B.B et Dasso, M. 2003. The small GTPase ran: Interpreting the signs. *Current Opinion In Cell Biology*. 15: 338-344.

Rajjou, L., Lovigny, Y., Job, C., Belghazi, M., Groot, S.P.C et Job, D. 2007. Seed quality and germination, in: S. Navie, S. Adkins, S. Ashmore (Eds.), Seeds: Biology, Development and Ecology. *CAB International*. pp. 324-332.

Rancourt, R.C., Tai, S., King, M., Heltshe, S.L., Penvari, C., Accurso, F.J et White, C.W. 2004. Thioredoxin liquefies and decreases the viscoelasticity of cystic fibrosis sputum. *A JP- Lung Cellular Molecular Physiology*. 286: L931-L938.

Reichheld, J. P., Meyer, E., Khafif, M., Bonnard, G., and Meyer, Y. 2005. AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*. 579:337-342.

Reichheld, J.P., Khafif, M., Riondet, C., Droux, M., Bonnard, G et Meyer, Y. 2007. Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in Arabidopsis development. *The Plant Cell*. 19: 1851-1865.

Reiss, E et Horstmann, C. 2001. Drechslera teres-infected barley (Hordeum vulgare L.) leaves accumulate eight isoforms of thaumatin-like proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 58: 183-188.

Rhazi, L., Cazalis, R., et Aussenac, T. 2003. Sulfhydryl-disulfide changes in storage proteins of developing wheat grain; influence on the SDS-unextractable glutenin polymer formation. *Journal of Cereal Science*. 38: 3-13.

Robert, N., Ferran, J., Breda, C., Coutos-Thévenot, P., Boulay, M., Buffard, D et Esnault, R. 2001. Molecular characterization of the incompatible interactions of Vitis vinifera

leaves with Pseudomonas syringae pv. pisi: expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *European Journal of Plant Pathology*. 107: 249-261.

Rouhier, N et Jacquot, J.P. 2005. The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and medicine*. 38: 1413-1421.

Rouhier, N., Gelhaye, E et Jacquot, J.P. 2002. Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *Journal of biological chemistry*. 277: 13609-13614.

Rouhier, N., Gelhaye, E., Sautiere, P.E., Brun, A., Laurent, P., Tagu, D., Gerard, J., de Faÿ, E., Meyer, Y et Jacquot, J.P. 2001. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve a tube that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiology*. 127: 1299-1309.

Rouhier, N., Kauffmann, B., Tete-Favier, F., Palladino, P., Gans, P., Branlant, G., Jacquot, J.P et Boschi-Muller, S. 2007. Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type A methionine sulfoxide reductases. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 3367-3378.

Rouhier, N., Vieira Dos Santos, C., Tarrago, L et Rey, P. 2006. Plant methionine sulfoxide reductase a and b multigenic families. *Photosynthesis Research*. 89: 247-262.

Rouhier, N., Villarejo, A., Srivastav, M., Gelhaye, E., Keech, O., Droux, M., Finkemeier, I., Samuelsson, G., Dietz, K.J., Jacquot, J.P et Wingsle, G. 2005. Identification of plant glutaredoxin targets. *Antioxidants & Redox Signal*. 7: 919-929.

Rutherford, G., Tanurdzic M., Hasebe M et Banks J.A. 2004. A systemic gene silencing method suitable for high throughput, reverse genetic analyses of gene function in fern gametophytes. *BMC Plant Biology*. 4- 6.

Saeed, U., Durgadoss, L., Valli, K., Joshi, D., Joshi, P et Ravindranath, V. 2008. Knockdown of Cytosolic Glutaredoxin 1 Leads to Loss of Mitochondrial Membrane Potential: Implication in Neurodegenerative Diseases. *PLoS One*. 3: e2459.

Sahrawy, M., Hecht, V., López-Jaramillo, J., Chueca, A., Chartier, Y et Meyer, Y. 1996. Intron position as an evolutionary marker of thiorédoxines and thioredoxin domains. *Journal of Molecular & Evolution*. 42: 422-431.

Sandiford, C.P., Tatham, A.S., Fido, R., Welch, J.A., Jones, M.G., Tee, R.D., Shewry, P.R., Newman et Taylor, A.J. 1997. Identification ofthe major water/salt insoluble wheat

proteins involved in cereal hypersensitivity. *Clinical & Experimental Allergy*. 27: 1120-1129.

Scandalios, J. G.1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant physiology*. 101: 7-12.

Schneider, K., Wells, B., Schmelzer, E., Salamini, F et Bartels, D. 1993. Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant Craterostigma plantagineum Hochst. *Planta*.189: 120-131.

Schultheiss, H., Dechert, C., Király, L., Fodor, J., Michel, K., Kogel, K.H et Hückelhoven, R. 2003. Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science*. 165: 1275-1280.

Schürmann, P et Jacquot, J.P. 2000. Plant thioredoxin systems revisited. *Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 371-400.

Serrato, A.J et Cejudo, F.J. 2003. Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta*. 217: 392-399.

Serrato, A.J., Crespo, J.L., Florencio, F.J et Cejudo, F.J. 2001. Characterization of two thioredoxins h with predominant localization in the nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. *Plant Molecular Biology*. 46: 361-371.

Serrato, A.J., Guilleminot, J., Meyer, Y et Vignols, F. 2008. AtCXXS: Atypical members of the Arabidopsis thaliana thioredoxin h family with a remarkably high disulfide isomerase activity. *Physiologia Plantarum*. 133: 611-622.

Serrato, A.J., Pérez-Ruiz, J.M et Cejudo, F.J. 2002. Cloning of thioredoxin h reductase and characterization of the thioredoxin reductasethioredoxin h system from wheat. *Biochemistry Journal*. 367: 491-497.

Serrato, A.J., Pérez-Ruiz, J.M., Spínola, M.C et Cejudo, F.J. 2004. A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 43821-43827.

Shahpiri, A., Svensson, B et Finnie, C. 2008. The NADPH-dependent thioredoxin reductase/thioredoxin system in germinating barley seeds: Gene expression, protein profiles, and interactions between isoforms of thioredoxin h and thioredoxin reductase. *Plant Physiology*. 146: 789-799.

Shewry, P.R., Tatham, A.S., Forde, J., Kreis, M et Miflin, B.J. 1986. The classification of wheat gluten proteins; a seassessment. *Journal of cereal Science*. 4: 97-106.

Shi, J et Bhattacharyya, M.K. 1996. A novel plasma membrane bound thioredoxin from soybean. *Plant Molecular Biology*. 32: 653-662.

Shrawat, A.K et Lorz, H. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotechnology Journal*. 4: 575-603.

Singh, S., Cornilescu, C.C., Tyler, R.C., Cornilescu, G., Tonelli, M., Lee, M.S et Maricley, J.L. 2005. Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from Arabidopsis thaliana, a cellular stress-related protein. *Protein science*. 14: 2601-2609.

Smart, D.D.K., Ortiz, K.L., Mattson, D., Bradbury, C.M., Bisht, K.S, Sieck, L.K., Brechbiel, M.W et Gius, D. 2004. Thioredoxin reductase as a potential molecular target for anticancer agents that induce oxidative stress. *Cancer Research*. 64: 6716-6724.

Smirnoff, N et Colombé, S.V. 1988. Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. *Journal of Experimental Botany*. 39: 1097-1108.

Stacy, R.A., Munthe, E., Steinum, T., Sharma, B et Aalen, R.B. 1996. A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, per1, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. *Plant of Molecular Biology*. 31: 1205-1216.

Stacy, R.A., Nordeng, T.W., Culianez-Macia, F.A et Aalen, R.B. 1999. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxydant, PER1, is localized to the nucleuss of barely embryo and aleurone cells. *The Plant Journal*. 216: 454-460.

Tamás, L., Huttová, J et Zigová, Z. 1997. Accumulation of stress-proteins in intercellular spaces of barley leaves induced by biotic and abiotic factors. *Biology of Plant*. 39: 387-394.

Traverso, J.A., Vignols, F., Cazalis, R., Pulido, A., Sahrawy, M., Cejudo, F.J., Meyer, Y et Chueca, A. 2007. PsTRXh1 and PsTRXh2 are both pea h-type thioredoxins with antagonistic behavior in redox imbalances. *Plant Physiology*. 143: 300-311.

Traverso, J.A., Vignols, F., Cazalis, R., Serrato, A.J., Pulido, P., Sahrawy, M., Meyer, Y., Cejudo, F.J et Chueca, A. 2008. Immunocytochemical localization of Pisum sativum TRXs f and m in non-photosynthetictissues. *Journal of Experimental Botany*. 59: 1267-1277.

Vainio, E., Kalimo, K., Reunala, T., Viander, M., and Palosuo, T. 1983. Circulating IgA et IgG-class antigliadin antibodies in dermatitis herpetiformis detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Archives of Dermatological Research*. 275: 15-18.

Van Breusegem, F et Dat, J.F. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*. 141: 384-390.

Van Loon, L.C., 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Pathogenesis-related proteins in plants. *Eds. S.K. Datta, S. Muthukrishnan, CRC Press LLC, Boca Raton*. 1-19.

Varjonen, E., Vainio, E et Kalimo, K. 2000. Antigliadin IgE indicator of wheat allergy in atopic dermatis. *Allergy*. 55: 386-391.

Verdoucq, L., Vignols, F., Jacquot, J.P., Hartier, Y et Meyer, Y.1999. In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 19714-19722.

Vieira Dos Santos, C., Laugier, E., Tarrago, L., Massot, V., Issakidis- Bourguet, E., Rouhier, N et Rey, P. 2007. Specificity of thiorédoxines and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of Arabidopsis plastidial methionine sulfoxide reductases b. *FEBS Letters*. 581: 4371-4376.

Vignols, F., Bréhélin, C., Surdin-Kerjan, Y., Thomas, D et Meyer, Y. 2005. A yeast two hybrid knockout strain to explore thioredoxininteracting proteins in vivo. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. 102: 16729-16734.

Voinnet, O., Vain, P., Angell, S et Baulcombe, D.C. 1998. Systemic spread of séquence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*. 195: 177-187.

Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J et Rausch, T. 2005. Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant Journal*. 41:15-30.

Waga, J., Zientarski, K., Obtulowicz, B., Bilo, B et Stachowicz, M. 2008. Gliadin immunoreactivity and dough rhealogical properties of winter wheat genotype modified by thioredoxin. *Cereal Chemistry*. 85: 488-494.

Washburn, M.P et Wells,W.W. 1999. The catalytic mechanism of the glutathione-dependent dehydroascorbate reductase activity of thioltransferase (glutaredoxin). *Biochemistry*. 38:268-274

Weichel, M., Glaser, A.G., Ballmer-Weber, B.K., Schmid-Grendelmeier, P et Crameri, R. 2006. Wheat and maize thioredoxins: A novel cross-reactive cereal allergen family related to baker's asthma. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 117: 676-681.

Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G., et Montfort, W. R. 1996. Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure*. 4:735-751.

Wieser, H., Seilmeier, W et Belitz, H.D. 1994. Quantitative determination of gliadin subgroups from different wheat cultivas. *Journal of Cereal Science*. 19: 149-155.

Williams, C.H., Arscott, L.D., Müller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.F., Veine, D. M., Becker, K et Schirmer, R.H. 2000. Thioredoxin reductase. Two modes of catalysis have evolved. *European Journal of Biochemistry*. 267: 6110-6117.

Williamson, J.D et Scandalios. 1992. Differential response of Maize catalase to abscisic cid-:Vp1 transcriptional activator is not required for abscisic acid-regulated cat1 expression. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. 89: 8842-8846.

Wolkers, W.F., van Kilsdonk, M.G et Hoekstra, F.A. 1998. Dehydration-induced conformational changes of polylysine as influenced by drying rate and carbohydrates. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1425: 127-136.

Wong, J.H., Balmer, Y., Cai, N., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Hurkman, W.J et Buchanan, B.B. 2003. Unraveling thioredoxin linked metabolic processes of cereal starchy endosperm using proteomics. *FEBS Letters*. 547: 151-156.

Wong, J.H., Cai, N., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Hurkman, W.J et Buchanan, B.B. 2004. Thioredoxin reduction alters the solubility of proteins of wheat starchy endosperm: An early event in cereal germination. *Plant and Cell Physiology*. 45: 407-415.

Wong, J.H., Kim, Y.B., Ren, P.S., Cai, N., Cho, M.J., Heden, P., Lemaux, P.G et Buchanan, B.B. 2002. Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence of communication between the endosperm and the embryo and aleurone. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. 99: 16325-16330.

Wong, J.H., Kobrehel, K., Nimbona, C., Yee, B.C., Balogh, A., Kiss, F et Buchanan, B.B. 1993. Thioredoxin and bread wheat. *Cereal Chemistry*. 70: 113-114.

Wood, Z.A., Schroder, E., Harris, J.P et Poole, L.B. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical sciences*. 28: 32-40.

Yamazaki, D., Motohashi, K., Kasama, T., Hara, Y et Hisabori, T. 2004. Target proteins of the cytosolic thioredoxins in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*. 45: 18-27.

Yano, H., Wong, J.H., Cho, M.J., and Buchanan, B.B. 2001a. Redox changes accompanying the degradation of seed storage proteins in germinating rice. *Plant Cell Physiology*. 42: 879-883.

Yano, H., Wong, J.H., Lee, Y.M., Cho, M.J et Buchanan, B.B. 2001b. A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. 98: 4794-4799.

Zago, E., Morsa, S., Dat, J.F., Alard, P., Ferrarini, A., Inze, D., Delledonne, M., et Van Breusegem, F. 2006. Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco, *Plant Physiology*. 141: 404-411.

Zahid, A., Gabarrou, J.F et Cazalis, R. 2008. Reducing and crosslinking wheat seed storage proteins with thioredoxin h. In Consumer Driven Cereal Innovation: *Where Science Meets Industry. ICC: Vienna*.

Zhang, P., Liu, B., Knag, S. W, Seo, M.S., Rhee, S. G et Obeid M.L. 1997. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 30615-30618.

Zhou, J. M. 1999. Signal transduction and pathogenesis-induced PR gene expression. In: Pathogenesis-related proteins in plants. *Eds. S.K. Datta, S. Muthukrishnan, CRC Press LLC, Boca Raton*. 195-207.