



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Collégium Sciences & Technologies
E.D. Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Biologie Végétale et Forestière

IFR 110 Génomique, Ecophysiologie et Ecologie Fonctionnelle
Unité Mixte de Recherche INRA/UL 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lorraine
en Biologie Végétale et Forestière

Par

Henri Pégeot

**Etude des glutathion transférases de la classe Phi du
peuplier (*Populus trichocarpa*) : caractérisation
structurale, enzymatique et recherche de molécules cibles.**

Soutenance prévue le 11 décembre 2015

Membres du jury:

Rapporteurs :	Dr. Pascal REY	Ingénieur CEA, Cadarache-AMU
	Dr. Elisabeth DAVIOUD-CHARVET	DR. CNRS, Strasbourg
Examineurs :	Pr. Frédéric BOURGAUD	PR. Université de Lorraine
	Dr. Nicolas NAVROT	MCF. Université de Strasbourg
Directeurs de thèse :	Pr. Nicolas ROUHIER	PR. Université de Lorraine
	Dr. Arnaud HECKER	MCF. Université de Lorraine
Invité :	Dr. Claude DIDIERJEAN	MCF. Université de Lorraine

Résumé : Les glutathion transférases (GSTs) constituent une famille multigénique d'enzymes présentes dans les trois domaines du vivant. Cette présence ubiquitaire souligne l'origine sans doute très ancienne de ces enzymes ainsi que des fonctions fondamentales conservées au cours de l'évolution. Ces enzymes sont impliquées notamment dans la détoxification cellulaire de molécules toxiques et dans le métabolisme secondaire. Les analyses phylogénétiques regroupent les GSTs des organismes photosynthétiques au sein de quatorze classes qui peuvent être séparées en deux grands groupes selon le résidu catalytique : les GSTs à sérine catalytique qui possèdent des activités de conjugaison du glutathion (GSH) et/ou peroxydase tandis que les GSTs à cystéine catalytique présentent des activités thioltransférase, déshydroascorbate réductase et de déglutathionylation. Les GSTs à sérine catalytique de la classe Phi (GSTF) sont présentes chez les organismes photosynthétiques et certains basidiomycètes. Chez les plantes, cette classe comprend un nombre de gènes plus important que les autres classes de GSTs. Ceux-ci sont parmi les plus régulés en réponse à divers stress et ils ont été fortement étudiés chez les plantes céréalières en raison de l'activité de détoxification des herbicides des protéines correspondantes. Pourtant, à quelques exceptions près, les rôles physiologiques des GSTFs restent inconnus et la redondance d'isoformes dans cette classe reste incomprise. Par des approches moléculaires, biochimiques et structurales, l'analyse structure-fonction des huit GSTFs de l'arbre modèle *Populus trichocarpa* a été réalisée au cours de cette thèse. L'analyse phylogénétique des GSTFs chez les organismes photosynthétiques a montré que cette classe est apparue au moment de l'apparition terrestre des végétaux et que différents groupes pouvaient être identifiés avec des motifs catalytiques distincts. L'analyse transcriptionnelle a montré que les gènes relatifs aux GSTFs de peuplier sont principalement exprimés dans les fleurs femelles, les pétioles et les fruits. Certains aspects du mécanisme réactionnel ont été caractérisés en déterminant notamment les paramètres cinétiques et d'interaction des huit GSTFs et de plusieurs variants mutés pour des résidus clés vis-à-vis de substrats modèles. Les structures de cinq des huit GSTFs ont été résolues et ces protéines dimériques adoptent un repliement GST canonique et des spécificités structurales au niveau du site actif ont pu être observées. De plus, au regard de la capacité des orthologues des GSTFs à lier des hormones et des flavonoïdes ainsi que de l'expression récurrente des GSTFs de peuplier dans les fruits et les fleurs femelles, deux organes riches en ces molécules, il peut être supposé qu'elles ont aussi des propriétés de type ligandine. Des résultats préliminaires ont également été obtenus pour la recherche de substrats physiologiques à partir de métabolites extraits de différents organes de peuplier. A terme, l'identification de ces substrats permettra de déterminer le mode d'action (catalytique vs ligandine) de chaque enzyme et d'identifier clairement les fonctions *in planta* de ces enzymes.

Mots clés : glutathion transférase ; *Populus trichocarpa* ; Phi ; structures cristallographiques ; mécanismes enzymatiques ; recherche de substrats

Abstract: Glutathione transferases (GSTs) belong to a multigenic family whose presence in most eukaryotes, prokaryotes and archaea reflects their widespread nature and very likely important functions. These enzymes represent a major group of enzymes involved in xenobiotic detoxification and secondary metabolism. From the most recent genomic and phylogenetic analyses, the GST family is subdivided into 14 classes that can be separated into two main groups based on the catalytic residue which is either a serine (Ser-GST) or a cysteine (Cys-GST). Ser-GSTs usually catalyze glutathione (GSH) conjugation and/or peroxide reduction. On the other hand, Cys-GSTs cannot perform GSH-conjugation reactions but instead catalyze thiol-transferase, dehydroascorbate reductase and deglutathionylation reactions. Ser-GSTs from the Phi class (GSTF) are present in photosynthetic organisms and some basidiomycetes. This class is composed of a large number of genes compared to other GST classes which are amongst the most stress-inducible. The corresponding proteins have been extensively studied in crops with regard to their detoxification activities toward herbicides. However, with a few exceptions, very little is known about their roles *in planta* and it is not well understood why this class has expanded. By combining molecular, cellular, biochemical and structural approaches, the eight isoforms from the model tree *Populus trichocarpa* have been characterized during this PhD project. Phylogenetic analysis of GSTFs in the green lineage shows that the apparition of this class is concomitant with the appearance of terrestrial plants and that different groups can be distinguished based on the active site signature. RT-PCR analysis of the eight isoforms of GSTFs showed that transcripts mostly accumulate in female flowers, petioles and fruits. Some aspects of the reaction mechanism have been characterized by determining kinetic parameters of the eight poplar GSTFs and of several mutated variants for key residues towards model substrates. The structures of five GSTFs have been solved and these dimeric proteins display a typical GST fold but specificities have been observed at the catalytic site level. Moreover, considering the demonstrated capacity of GSTF orthologs to bind hormones, anthocyanins or flavonoids, and the consistent high expression of poplar GSTFs in female flowers and fruits, two organs rich in these molecules, we speculate that they may also possess ligandin properties. Preliminary results have been obtained regarding the nature of the substrates in various poplar organs by analyzing protein thermostability in the presence of putative ligands. In order to assess whether a functional redundancy between poplar Phi GSTs exists and to identify their mode of action (catalytic vs ligandin functions), we started to isolate and identify physiological substrates.

Key words: Glutathione transferase; *Populus trichocarpa*; Phi; crystal structures; enzymatic mechanisms; research of substrates.

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury, Frédéric Bourgaud, Pascal Rey, Elisabeth Davioud-Charvet et Nicolas Navrot pour avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux de thèse. Je souhaite également remercier les personnes avec qui j'ai pu collaborer durant cette thèse, notamment Claude, Sébastien, Sandrine Mathiot et Frédéric.

À tout seigneur tout honneur dit-on. Je tiens avant tout évidemment à remercier Nicolas sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. On le sait, entre le premier et le dernier jour d'un thésard dans un laboratoire, les devoirs d'un directeur de thèse sont nombreux. Tu t'en es acquitté avec panache tout en ayant su rester sympathique et bienveillant. Merci beaucoup pour les relectures et surtout la réactivité, l'efficacité et la pertinence des corrections ! Pour citer Frédérique Dard, un auteur que tu apprécies je crois, je dirais que t'es un fortiche, l'homme qui remplace la Végétaline et l'eau bouillante ! Merci également pour les balades en VTT (trop rares !)

Je tiens également à remercier Arnaud pour m'avoir encadré pendant cette thèse. Merci pour les discussions scientifiques, les corrections, les relectures. Mais ce n'est pas tout ! Merci pour les covoiturages, les séances de squash et de badminton ainsi que d'avoir été un encadrant amical ! Et maintenant grâce à toi je sais que mon téléphone n'est pas bièreproof ! Quelle arnaque ;-).

Je remercie particulièrement Jean-Pierre pour la finesse de ses traits d'esprits, sa modestie (t'aurais aimé être moi ?), ses saluts virils, sa maîtrise du contrepèd et de m'avoir fait découvrir des chouettes coins en VTT aux alentours de Nancy !

J'adresse également un grand merci à toutes les personnes qui ont partagé mon bureau, surtout la team finale de copain composée de PA, Johnny et Valette ! Des moments de délire inoubliables ! PA, présent depuis mon stage de M2 jusqu'au presque bout du bout de ma thèse (t'étais presque un meuble), j'ai particulièrement apprécié ton humour pince-sans-rire dont tu as le secret. Merci Johnny, t'es aussi sympa que t'es beau, et t'es quand même vachement sympa ;-)

Merci pour ces petites séances de courses à pied, et de m'avoir fait découvrir le triathlon, une belle expérience. L'année prochaine le X-terra, c'est sûr ! Valette, vindou de sacré beuyot, ne change rien, tu fais honneur à la haute zone ! Si tu manges un peu plus de jambon peut-être t'arriveras un jour à me battre à Hearthstone ? Merci également aux anciens

du bureau, Yann pour ses soirées jeux de société, Benji pour ses blagues truculentes, Edgar le maître trasheur et Anne pour sa passion inextinguible pour la musique.

Une mention spéciale à Thomas Perrot (X-tra large ! NAniiiiii, Nanda), pour m'avoir supporté comme encadrant pendant son stage. De tes salutations respectueuses et ton vouvoiement du début tu seras devenu un bon copain. L'avenir des GSTs repose sur toi !

J'adresse mes remerciements à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au labo pendant ces trois années avec qui c'est toujours un plaisir d'échanger : Jé (le meilleur encadrant de M2 qui soit !) Rodnay, Mélanie, Eric, Tiphaine, Jean-Michel, Fanny, Flavien, Aude, Kamel, Chantal, Antoine, Béatrice, Raphaël, Eléna et Aurélie.

Sur un registre plus personnel, je tiens à remercier mes parents et ma sœur, il paraît que l'on ne choisit pas sa famille mais en l'occurrence, j'ai beaucoup de chance. Merci pour votre affection et votre soutien inconditionnel !

Enfin ces dernières lignes sont adressées à Cécile, en plus de tout ce que tu es pour moi, qui se passe de mots, tu m'as soutenu, encouragé et remonté le moral dans les coups durs et pour ça (et plus encore), je te suis reconnaissant du fond du cœur.

Et à Funette, je dis : « Pout pout !! ».

Table des matières

REMERCIEMENT.....	5
TABLE DES MATIERES.....	9
ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15
1. Préambule.....	17
2. Le métabolisme oxydant chez les plantes	18
2.1. La production des EORs et ENRs	19
2.2. Les dommages cellulaires causés par les EORs et ENRs.....	21
2.2.1. Les acides nucléiques	21
2.2.2. Les protéines	22
2.2.3. Les lipides	23
2.3. La détoxification des EORs et des ENRs	24
2.4. Les défenses non-enzymatiques	24
2.5. Les défenses enzymatiques.....	26
2.6. L'implication des EORs et des ENRs dans la signalisation redox	28
3. Le glutathion	31
3.1. Découverte.....	31
3.2. Structure, synthèse et régénération du glutathion	32
3.3. La signalisation et les fonctions du glutathion	35
4. Les glutathion transférases.....	37
4.1. Les GSTs, des enzymes de la superfamille des thiorédoxines.....	37
4.2. Les grands types de GSTs	40
4.2.1. Les MAPEGs.....	42
4.2.2. Les GSTs kappa	43
4.2.3. Les GSTs cytosoliques.....	43
4.3. Phylogénie des GSTs canoniques de plantes	46
4.4. Organisation génomique et modèle évolutif des glutathion transférases solubles	48
4.5. Caractéristiques structurales des GSTs solubles de plantes	53
4.5.1. Le monomère	53
4.5.2. Le site actif	55
4.5.3. Le dimère.....	59
4.5.4. Le site ligandine (site L)	61
4.6. Mécanismes enzymatiques employés par les glutathion transférases.....	63
4.6.1. Les cystéines réactives	63
4.6.2. Activité de conjugaison du glutathion	64
4.6.3. Activité glutathion peroxydase	67
4.6.4. Activité isomérase	68
4.6.5. Activité de déglutathionylation	69
4.7. Fonctions associées aux GSTs canoniques de plantes	72
4.7.1. Les classes de GSTs à cystéine.....	72
4.7.1.1. Déshydroascorbate réductase (DHAR)	72
4.7.1.2. Lambda (GSTL).....	73
4.7.1.3. Glutathionyl-hydroquinone réductases (GHRs).....	74
4.7.1.4. Hémérythrine (H)	75

4.7.1.5.	Iota (I)	76
4.7.2.	Les classes de GSTs à sérine	76
4.7.2.1.	Thêta (T)	76
4.7.2.2.	Zêta (Z).....	77
4.7.2.3.	Tétra-chlorohydroquinone déhalogenase (TCHQD)	79
4.7.2.4.	Les GSTs Phi (F) et Tau(U).....	80
PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS		93
RESULTATS		101
5. Article 1: The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1		103
6. Article 2 : The structural and sequence permissiveness in the glutathione transferase Phi class: natural combination of catalytic residues confers dual biochemical functions		122
7. Chapitre 3 : Vers l'identification et la caractérisation des substrats des glutathion transférases de la classe Phi du peuplier <i>Populus trichocarpa</i>		169
7.1.	Matériels et méthodes relatifs au chapitre 3.....	169
7.1.1.	Collecte et préparation du matériel végétal	169
7.1.2.	Extraction des métabolites secondaires à l'aide d'un extracteur de Soxhlet.....	169
7.1.3.	Extraction méthanolique de métabolites secondaires.....	170
7.1.4.	Fractionnement d'extraits par chromatographie haute performance.....	171
7.1.5.	Analyses des extraits par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)	171
7.1.6.	Etude de l'interaction protéines-ligands/substrats par analyse de la thermostabilité des protéines	172
7.1.7.	Etude de l'interaction protéines-ligands/substrats par compétition enzymatique	172
7.1.7.1.	Analyse de l'activité estérase	172
7.1.7.2.	Tests d'inhibitions compétitives à l'aide de la 4-méthylumbelliféryl acétate	173
8. Résultats.....		174
8.1.	Extraction et analyse des principaux métabolites secondaires contenus dans différents organes/tissus prélevés chez le peuplier (<i>P. trichocarpa</i>).....	174
8.2.	Extraction par macération méthanolique à froid.....	175
8.3.	Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) des extraits obtenus	176
8.4.	Recherche de substrats et de ligands potentiels des GSTFs de <i>P. trichocarpa</i>	179
8.5.	Etude de l'interaction GSTF-ligands/substrats par analyse de la thermostabilité des protéines (Fluorescence-based Thermal Shift Assay).....	179
8.6.	Effets des fractions extraites à l'eau à partir de fleurs femelles de peuplier sur la thermostabilité de GSTF1 ...	183
8.7.	Mesure de l'activité estérase de GSTF1 de peuplier.....	184
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....		191
9. Expansion et cas de la redondance fonctionnelle de la classe GSTF du peuplier		194
10. Variation et importance des acides aminés du motif catalytique des GSTs		200
11. Fonctions cellulaires des GSTFs		203
12. Vers l'identification et la caractérisation des substrats des GSTFs.....		206
REFERENCES.....		213

Abréviations

4-MOA : 4-méthylumbelliféryl acétate

ABC : ATP-binding cassette

Asc : Ascorbate

ADN : Acide désoxyribonucléique

BITC : benzyl-isothiocyanate

CuOOH : Hydroperoxyde de cumène

DHA : Déshydroascorbate

DsbA : Disulfide bond A

CDNB : 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène

EOR : Espèce oxygénée réactive

ENR : Espèce nitrée réactive

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

GPX : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GRX : Glutarédoxine

GSH : Glutathion

GSSG : Disulfure de Glutathion

GST : Glutathion transférase

HED : Hydroxyéthyl disulfide

HNE : 4-hydroxynonéal

MAPEG : Membrane associated proteins in eicosanoids and glutathione metabolism

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

PDB : Protein data bank

PITC : Phényl isothiocyanate

PNP-butyrate : 4-Nitrophényl butyrate

PRX : Peroxyrédoxine

TRX : Thiorédoxine

Introduction

1. Préambule

Le travail réalisé au cours de cette thèse porte sur la caractérisation structure-fonction des glutathion transférases (GST) du peuplier. Le fonctionnement de ces enzymes ubiquitaires au vivant s'articule principalement autour de leur interaction avec le glutathion, un tripeptide contenant une cystéine. Le glutathion possède des fonctions nombreuses et diverses souvent associées au métabolisme oxydant qui fera donc l'objet d'un court chapitre introductif. Dans un deuxième temps, je m'attacherai à décrire les caractéristiques du glutathion et son implication dans le fonctionnement cellulaire. Enfin, la dernière partie de cette revue bibliographique portera sur la phylogénie, l'évolution, les propriétés structurales et enzymatiques ainsi que sur les fonctions identifiées des GSTs chez les plantes.

2. Le métabolisme oxydant chez les plantes

Les processus métaboliques cellulaires aérobies tels que la respiration et la photosynthèse ainsi que l'action de certaines oxydases entraînent la production d'espèces oxygénées réactives (EORs) et d'espèces nitrées réactives (ENRs) (Apel *et al.*, 2004). Les EORs et ENRs sont des oxydants puissants qui à faible concentration sont impliqués dans la signalisation cellulaire. En revanche, à des concentrations plus fortes, ils peuvent endommager des macromolécules biologiques clés telles que les acides nucléiques, les lipides et les protéines. Les propriétés cytotoxiques de ces molécules sont à l'origine de l'évolution de systèmes complexes dédiés à leur élimination. Dans des conditions physiologiques normales, il existe un équilibre entre la production et l'élimination de ces molécules. Cependant, les plantes terrestres, immobiles, ne peuvent échapper aux conditions environnementales défavorables comme le ferait simplement un animal en se déplaçant. Le manque ou l'excès d'eau, les variations d'éclairement, la pollution, la salinité des sols, les changements de température, l'exposition à divers polluants ou encore l'infection par des organismes pathogènes peuvent déséquilibrer l'homéostasie cellulaire et entraîner une surproduction d'EORs et d'ENRs (Apel *et al.*, 2004). Si les quantités de ces molécules oxydantes excèdent la capacité des cellules à les éliminer, il en résulte une situation de stress oxydant altérant le fonctionnement physiologique normal de la cellule. La figure 1 permet d'appréhender les quatre principales facettes articulées autour des EORs et ENRs que sont leur production, la signalisation redox, la détoxification enzymatique et non-enzymatique et les dommages cellulaires. Ces différents aspects seront détaillés dans les prochains paragraphes.

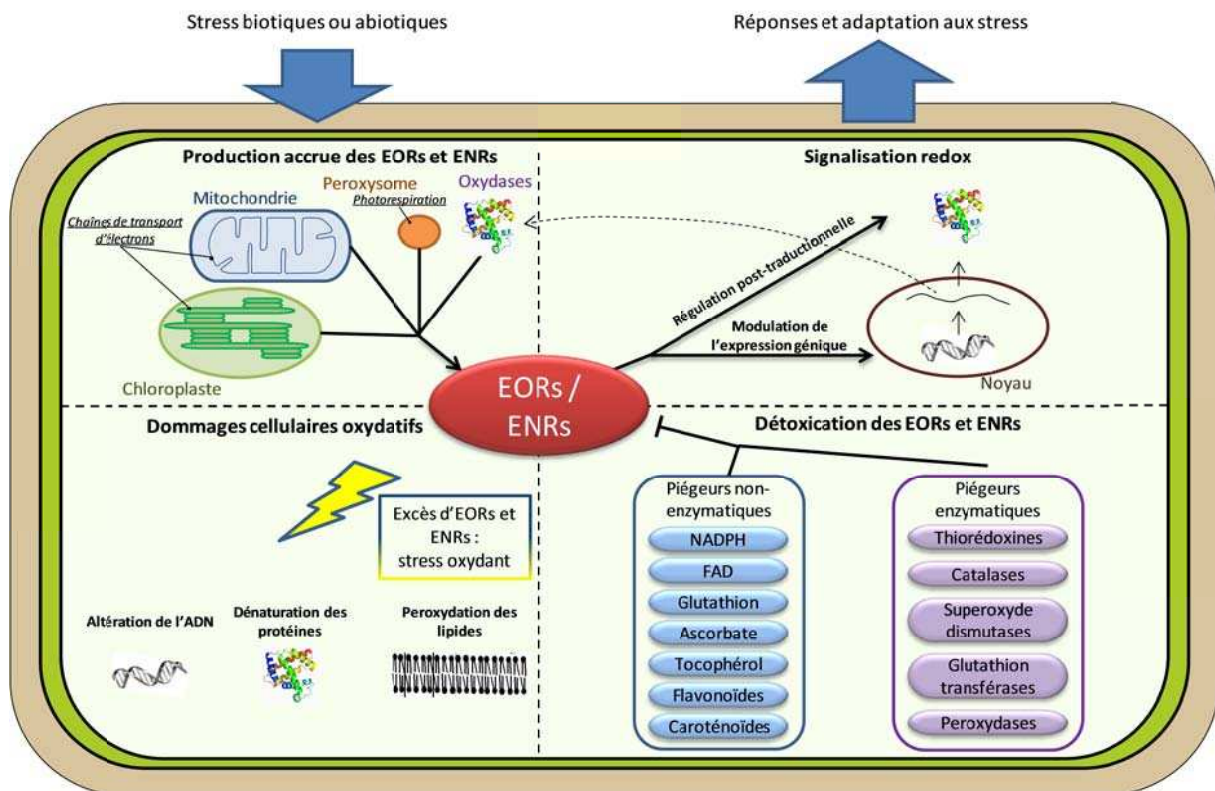


Figure 1 : EORs et ENRs : production, signalisation, détoxication et dommages cellulaires oxydatifs. Les stress biotiques et abiotiques entraînent une surproduction d'EORs et d'ENRs principalement au niveau des chloroplastes, des mitochondries et des peroxysomes. Des systèmes de détoxication enzymatiques et non-enzymatiques permettent d'éliminer les EORs et les ENRs lorsqu'ils sont en excès, limitant ainsi les dommages oxydatifs de ces molécules et modulant la signalisation dépendant de ces molécules.

2.1. La production des EORs et ENRs

La plupart des EORs et ENRs sont des dérivés de l' O_2 . Du point de vue de la chimie quantique, l' O_2 possède deux électrons non appariés de spin parallèle défini par un état triplet. Les molécules organiques sont constituées d'atomes dont tous les électrons sont appariés et sont par définition à l'état singulet. L'état triplet de l'oxygène interdit toutes réactions spontanées avec les molécules du vivant à l'état singulet en raison d'une barrière énergétique infranchissable (Deby-Dupont *et al.*, 2002). *In vivo*, le franchissement de cette barrière peut se faire de façon contrôlée par des enzymes, catalyseurs biologiques, de la classe des oxydases (qui catalysent le passage de l'oxygène triplet à l'état doublet radicalaire) et des oxygénases (qui catalysent le passage des molécules organiques de l'état singulet à doublet radicalaire). La réduction monoélectronique de l'oxygène forme l'oxygène triplet à l'état doublet radicalaire (ion superoxyde, $O_2^{\bullet-}$). La dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$, spontanée ou catalysée par les superoxyde dismutases (SOD), mène à la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , non

radicalaire) (Bowler *et al.*, 1994), ou au peroxyde d'hydrogène (ONOO⁻, non radicalaire) par réaction avec le monoxyde d'azote (NO•, radicalaire) produit par la NO-synthétase (figure 2) (Rinalducci *et al.*, 2008).

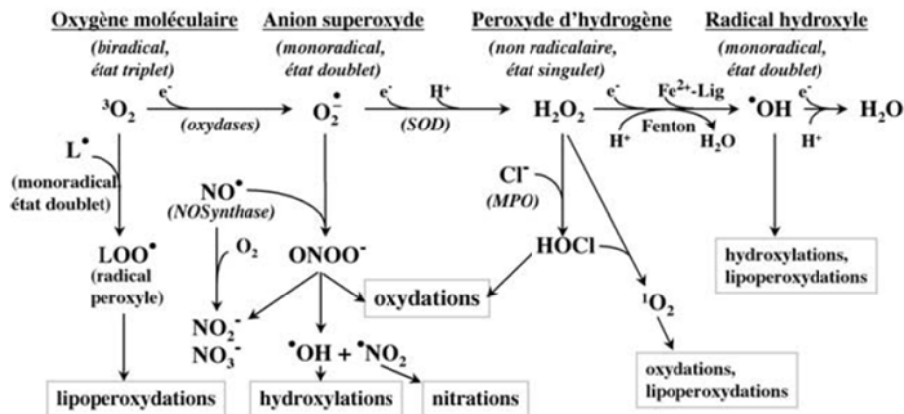


Figure 2 : Production des espèces oxygénées et nitrées réactives à partir de l'oxygène moléculaire ou dioxygène $^3\text{O}_2$ (couramment représenté par O_2) (Deby-Dupont *et al.*, 2002). Les abréviations suivantes ont été utilisées : e^- : électron ; $\text{O}_2^{\bullet-}$: anion superoxyde ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; $^\bullet\text{OH}$: radical hydroxyle ; HOCl : acide hypochloreux ; $^1\text{O}_2$: oxygène singulet ; $\text{NO}^\bullet$: monoxyde d'azote ; NO_2^- : nitrites ; NO_3^- : nitrates ; ONOO^- : peroxyde d'hydrogène ; $^\bullet\text{NO}_2$: radical nitryle ; $\text{Fe}^{2+}\text{-Lig}$: complexe du fer ferreux avec un ligand activateur (Lig) ; $\text{L}^\bullet$: radical lipidique. SOD : superoxyde dismutase ; MPO : myéloperoxydase.

Le peroxyde d'hydrogène et l'ion superoxyde, très instables et très oxydants, peuvent conduire à la formation d'autres espèces actives (tableau 1) comme les radicaux $^\bullet\text{OH}$ et $^\bullet\text{NO}_2$ qui sont à la base des réactions de nitrations et d'hydroxylations. Les espèces radicalaires se singularisent des espèces non-radicalaires par la présence d'un électron non apparié (signalé par $\bullet$). Ce dernier est à l'origine d'une forte réactivité de ces molécules qui, de fait, sont particulièrement instables et peuvent oxyder presque toutes les molécules du vivant. Les espèces non radicalaires sont plus stables et peuvent diffuser et réagir donc avec diverses molécules qui pouvaient être à l'origine à des distances considérables.

Espèces oxygénées réactives		Espèces nitrées réactives	
Radicaux	Non-radicaux	Radicaux	Non-radicaux
- Superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) - Hydroxyle ($OH^{\bullet-}$) - Peroxyle ($ROO^{\bullet-}$) - Alkoxy ($RO^{\bullet-}$) - Hydroperoxy ($HOO^{\bullet-}$)	- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) - Ozone (O_3) - Oxygène singulet (1O_2) - Acide hypochloreux ($HOCl$)	- Oxyde nitrique ($NO^{\bullet-}$) - Dioxyde de nitrogène (NO_2)	- Acide nitreux (HNO_2) - Cation nitrosyle (NO^+) - Anion nitrosyle (NO^-) - Peroxynitrite ($ONOO^-$) - Trioxyde de d'azote (N_2O_3) - Peroxyde d'azote (N_2O_4) - Alkyl peroxyxynitrate ($ROONO^-$) - Anion nitroxy (NO^-)

Tableau 1 : Principales espèces oxygénées et nitrées réactives rencontrées dans les cellules végétales.

La fuite d'électrons non contrôlée au niveau des chaînes de transport d'électrons des chloroplastes (Asada 2006) et des mitochondries (Møller 2001) est principalement à l'origine de la formation d' $O_2^{\bullet-}$ dont dérivent la majorité des EORs et ENRs. En situation de stress, les électrons peuvent être en excès au niveau des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les électrons excédentaires peuvent s'échapper et réagir avec l' O_2 environnant. De plus, la dernière étape de transfert d'électron mitochondriale permet la réaction suivante : $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$. Cette réaction est parfois incomplète et dans ce cas un atome d'oxygène peut être à l'origine de la formation d'EORs. Au niveau des chloroplastes, lors de modifications physiologiques et/ou de perturbations environnementales, l'intensité lumineuse reçue peut excéder celle requise pour l'assimilation de carbone. La chaîne de transport d'électrons initiée au niveau de la photolyse de l'eau est alors saturée. Le surplus d'électrons s'échappe de cette chaîne et peut réduire l' O_2 intracellulaire. Enfin, le peroxysome, est également responsable d'une formation importante d'EORs de par son rôle dans la photorespiration et la bêta-oxydation des lipides (del Rio *et al.*, 2006). En effet, un des sous-produits de la photorespiration est le glycolate. Celui-ci est métabolisé en glycine dans les peroxysomes dans une réaction produisant de l' H_2O_2 . La bêta-oxydation quant à elle permet de dégrader des acides gras sous l'action d'oxydases qui entraînent également la formation d' H_2O_2 .

2.2. Les dommages cellulaires causés par les EORs et ENRs

2.2.1. Les acides nucléiques

Les EORs et ENRs sont, en condition de stress oxydant, à l'origine de modifications très diverses de l'ADN nucléaire, mitochondrial ou chloroplastique. Les premières bases

atteintes lors de l'oxydation de l'ADN sont les cytosines et les thymines. Cependant, l'oxydation de ces bases induit généralement, par transfert de l'état oxydé, l'oxydation d'une guanine ou d'une adénine voisine. Il se forme alors les bases 8-oxoguanine et 8-oxoadénine, produits majeurs de l'oxydation de l'ADN (Bergeron *et al.*, 2010). A titre d'exemple, la formation de 8-oxoguanine peut conduire à un mauvais appariement avec l'adénine et donc à des substitutions de la guanine en thymine (Cheng *et al.*, 1992). Une des modifications les plus problématiques causée par ces molécules oxydantes est la cassure de la molécule double brin d'ADN principalement en raison de l'attaque d'un radical sur le désoxyribose mais aussi par le biais de multiples altérations des bases puriques ou pyrimidiques.

2.2.2. *Les protéines*

En condition de stress oxydant, les protéines sont susceptibles d'être altérées par les EORs et les ENRs. La biochimie de l'oxydation des protéines est complexe et ne peut être détaillée ici de façon exhaustive. Les espèces radicalaires peuvent oxyder la chaîne principale des protéines. Notamment, le carbone- α de la liaison peptidique peut être déprotoné. Il peut alors réagir avec l'oxygène moléculaire, formant un radical peroxyde menant à la fragmentation de la protéine en polypeptide (Davies 1996). Toutefois, l'oxydation touche plus souvent les chaînes latérales. A titre d'exemple, l'oxydation des acides aminés aliphatiques par $\text{OH}\cdot$ mène à la formation de dérivés hydroxylés comme il l'est montré pour la valine sur la figure 3 (Fu *et al.*, 1995). L'oxydation des acides aminés aromatiques se caractérise souvent par des réactions d'addition. La tyrosine peut être par exemple oxydée en radical phénoxyde. Ce radical peut réagir avec d'autres espèces radicalaires pour former des pontages covalents intra- ou intermoléculaires. Toutes les chaînes latérales des acides aminés constituant les protéines sont susceptibles d'être oxydées par les EORs et les ENRs. Les tryptophanes, les histidines les phénylalanines constituent néanmoins des cibles privilégiées tandis que les méthionines et les cystéines sont les plus sensibles à l'oxydation en raison de la présence d'un atome de soufre au niveau de leur groupement thiol ($-\text{SH}$) (figure 3). Le soufre de la méthionine peut ainsi être rencontré sous forme sulfoxyde ou sulfone tandis que l'atome de soufre des cystéines peut adopter des formes d'oxydation encore plus variées, certaines étant irréversibles (figure 3) (Cooper *et al.*, 2002).

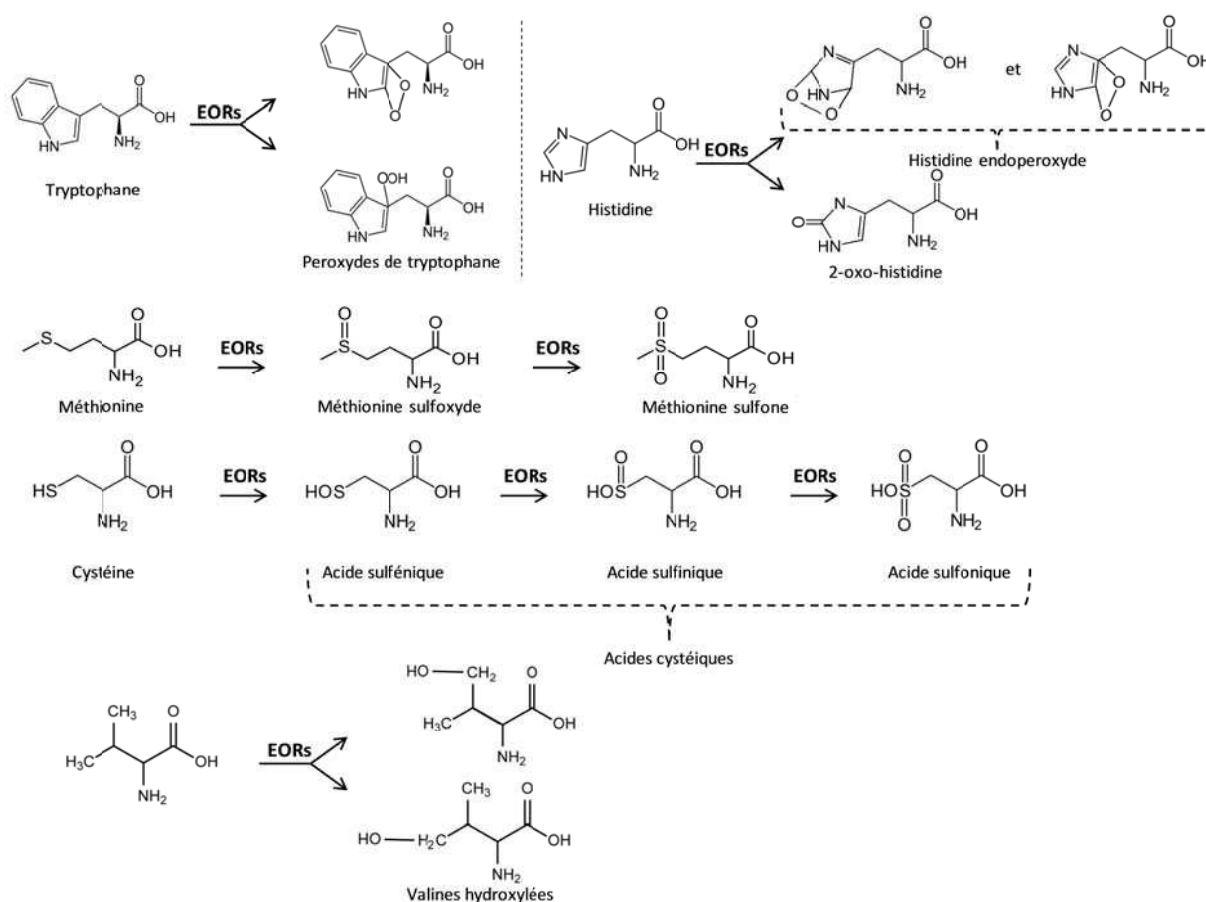


Figure 3 : Exemple d'oxydation de certains acides aminés par les EORs.

L'oxydation de ces acides aminés soufrés modifie les propriétés physico-chimiques des protéines pouvant mener à la perte de fonction des protéines, affectant le fonctionnement cellulaire. A l'inverse, l'oxydation de résidus cystéinyles constitue également un moyen de réguler l'activité des protéines. Ainsi, les enzymes du cycle de Calvin possèdent des groupements thiols dont la sensibilité à l'oxydation permet de les inactiver transitoirement (Kaiser 1979).

2.2.3. Les lipides

Les lipides sont également sensibles à l'oxydation par différents oxydants, les plus sévèrement atteints étant les phospholipides. Cela s'explique par le fait que la liaison ester entre le glycérol et les acides gras est un site d'attaque privilégié par les EORs. De plus, les doubles liaisons carbone-carbone sur les chaînes aliphatiques des phospholipides insaturés peuvent être sujettes à la déshydrogénation d'un carbone saturé voisin par l'attaque d'un radical tel qu' $\text{OH}\cdot$. Le radical lipidique produit interagit avec une molécule d' O_2 pour former un radical peroxyde puis un hydroperoxyde après hydrogénation. *In vivo*, les phospholipides insaturés représentent la composante principale des membranes biologiques par leur

juxtaposition. Il est courant que la dernière étape d'hydrogénation se produise par arrachement d'un atome d'hydrogène au phospholipide voisin, formant un nouveau radical peroxy puis hydroperoxyde. L'oxydation des phospholipides de proche en proche constitue la réaction en chaîne de peroxydation lipidique. Cette réaction, si elle n'est pas stoppée, se traduit par une perte d'intégrité des membranes biologiques très dommageable pour la cellule (Moller *et al.*, 2007). Cette perte affecte la fluidité des membranes, affectant le fonctionnement des membranes en raison de mouvements limités des lipides et des protéines membranaires modifiés.

2.3. La détoxification des EORs et des ENRs

Les EORs et des ENRs de par leurs rôles dans la signalisation cellulaire contrôlent de nombreux processus cellulaires des plantes. Cependant, leur cytotoxicité peut être à l'origine de dommages cellulaires importants. Les subtilités de ce paradoxe restent largement mystérieuses et suscitent un fort intérêt dans la communauté scientifique. Néanmoins, il est clair que les concentrations cellulaires de ces molécules doivent être finement régulées. Les plantes, comme les autres organismes aérobies, ont développé diverses stratégies de gestion des EORs et ENRs. Le système de défense antioxydant repose sur plusieurs stratégies : l'évitement de la production d'EORs et d'ENRs ; la réparation des dommages provoqués sur les molécules biologiques ; l'élimination des EORs et des ENRs. La détoxification de ces molécules est réalisée à l'aide de petites molécules ou d'enzymes antioxydantes.

2.4. Les défenses non-enzymatiques

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques comprennent notamment le glutathion (GSH) et l'ascorbate (Asc) qui représentent les tampons redox majeurs ainsi que l' α -tocophérol (vitamine E), les flavonoïdes et les caroténoïdes. Ces molécules sont considérées comme des antioxydants en vertu de leur capacité à réduire des EORs et ENRs sans être oxydées elles-mêmes en espèces fortement réactives. L'ascorbate et le glutathion sont capables de neutraliser spontanément plusieurs EORs et ENRs comme l' $\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, 1°O_2 , $1^\circ\text{H}_2\text{O}_2$ et 1°ONOO_2 (Foyer *et al.*, 2011). La réduction des molécules oxydantes entraîne l'oxydation du glutathion en disulfure de glutathion (GSSG) et de l'ascorbate en monodéshydroascorbate (MDHA) et déshydroascorbate (DHA). Le cycle ascorbate-glutathion permet la régénération du GSH et de l'Asc (figure 4) (Halliwell 2005).

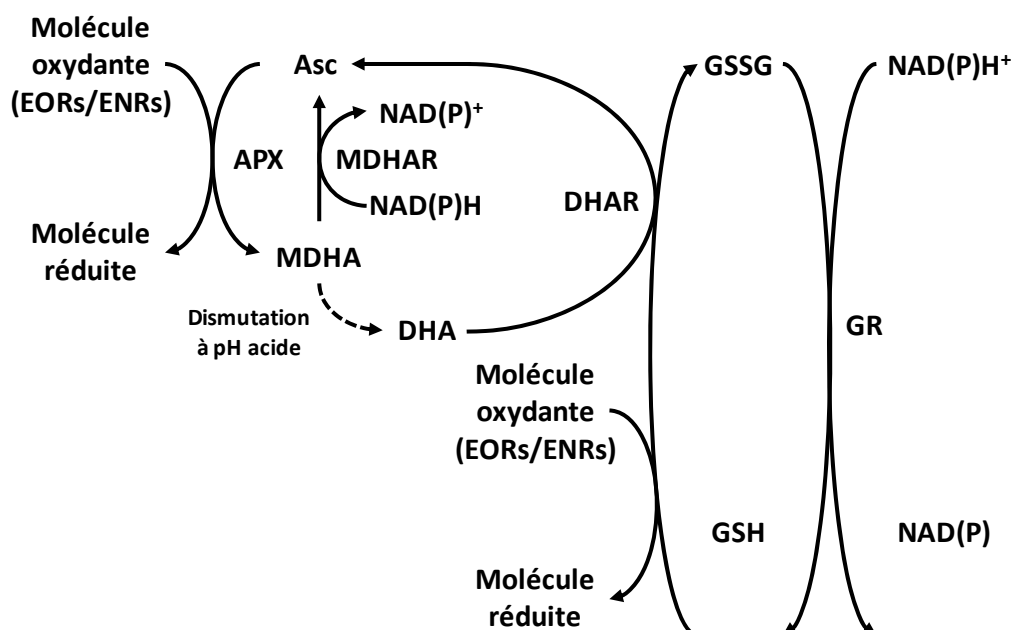


Figure 4 : le cycle ascorbate-glutathion permettant de réduire des EORs et ENRs et de régénérer l'ascorbate et le glutathion (adapté de (Latowski *et al.*, 2010)). Asc : ascorbate, APX : ascorbate peroxydase, DHA: déhydroascorbate, DHAR : déshydroascorbate réductase, MDHA : monodéshydroascorbate, GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion disulfure (oxydé).

D'autre part, le GSH pourrait avoir un rôle protecteur pour certaines protéines. En effet, les groupements thiols des protéines peuvent être glutathionylés (formation d'une liaison covalente avec le GSH) soit par réaction entre des radicaux thiyles ($RS\cdot$) et le GSH ou par réaction avec le GSSG ou le GSNO (nitrosogluthion), des réactions favorisées en condition de stress oxydant. La glutathionylation pourrait donc représenter un mécanisme de protection des thiols libres protéiques contre des dommages oxydatifs irréversibles. Chez *Arabidopsis thaliana*, des enzymes du cycle de Calvin peuvent être glutathionylées mais la portée physiologique de cette modification reste souvent inconnue (Ito *et al.*, 2003).

L' α -tocophérol est le composé anti-radicalaire le plus important des membranes biologiques qui peut contrer la propagation des réactions de peroxydation lipidique en chaîne en réduisant les radicaux peroxydes intermédiaires (Halliwell 2005). L' α -tocophérol est alors oxydé en α -tocophéryl qui est régénéré par l'ascorbate. D'autre part, de nombreux métabolites secondaires possèdent des propriétés antioxydantes. Par exemple, les caroténoïdes permettent de prévenir la formation d'EORs en cas de stress lumineux en dissipant l'énergie excessive absorbée par les molécules de chlorophylle au niveau des photosystèmes (Demmig-Adams 1990). Ils sont également, comme les flavonoïdes, de très bons piègeurs d'EORs de par leur nature phénolique.

2.5. Les défenses enzymatiques

Bien que certaines réactions de neutralisation des EORs et des ENRs puissent se produire de manière spontanée, il existe également des systèmes enzymatiques spécialisés de réduction de ces molécules. Les superoxyde dismutases (SODs) constituent la première ligne de défense et catalysent la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en O_2 et en H_2O_2 . L' H_2O_2 formé est réduit en eau par des glutathion peroxydases (GPXs) qui utilisent le pouvoir réducteur du glutathion ou des thiorédoxines, des peroxyrédoxines (PRXs) qui utilisent le pouvoir réducteur des thiorédoxines ou des glutarédoxines, des ascorbate peroxydases (APXs) qui utilisent le pouvoir réducteur de l'ascorbate ainsi que par des catalases (CATs) qui utilisent des changements d'état redox du fer hémique et qui ont la particularité de former également du dioxygène (Baier *et al.*, 1996). Les GPXs et PRXs sont particulières également par leur capacité à décomposer également le peroxy-nitrite et les lipides peroxydés. Différentes isoformes de ces enzymes sont retrouvées dans presque tous les compartiments subcellulaires. La multiplicité de ces systèmes met clairement en exergue l'importance de la gestion des molécules oxydantes dans tous les organites.

Une autre stratégie utilisée par la cellule est l'évitement de la production d'EORs et d'ENRs. Cela est parfaitement illustré par l'alternative oxydase (AOX). Dans certaines situations, cette enzyme mitochondriale entre en compétition avec la cytochrome oxydase du complexe IV de la chaîne de transport d'électron pour l'acceptation des électrons diminuant ainsi leur fuite et donc la formation d'EORs et d'ENRs (Vanlerberghe *et al.*, 1997).

D'autres enzymes sont spécialisées dans la réparation des dommages causés par les molécules oxydantes. L'exemple de la réduction des peroxydes lipidiques par les PRXs a déjà été mentionné ci-dessus. Au niveau des protéines, les systèmes de réparation les mieux documentés concernent la régénération des méthionines et des cystéines oxydées. Les méthionine sulfoxyde réductases (MSRs) sont ainsi capables de réduire les méthionine sulfoxydes en méthionines, qu'elles soient libres ou intégrées dans une protéine (Brot *et al.*, 1981). La régénération des cystéines oxydées est quant à elle assurée par différents mécanismes impliquant notamment des disulfure réductases de la famille des thiorédoxines (TRXs) et des glutarédoxines (GRXs). Il est intéressant de noter que le cycle catalytique de nombreuses enzymes des systèmes antioxydant thiol-dépendants, tels que les PRXs ou les MSRs, implique également des changements d'états d'oxydation du soufre de leur cystéine catalytique. Ces cystéines oxydées, sous forme d'acides sulféniques ou plus souvent sous la

forme de ponts disulfures ou d'adduits glutathion, sont régénérés spécifiquement par des GRXs et/ou des TRXs (Rouhier *et al.*, 2001, Rouhier *et al.*, 2006). La figure 5 illustre la réduction des MSRs possédant 2 cystéines catalytiques par le système TRX.

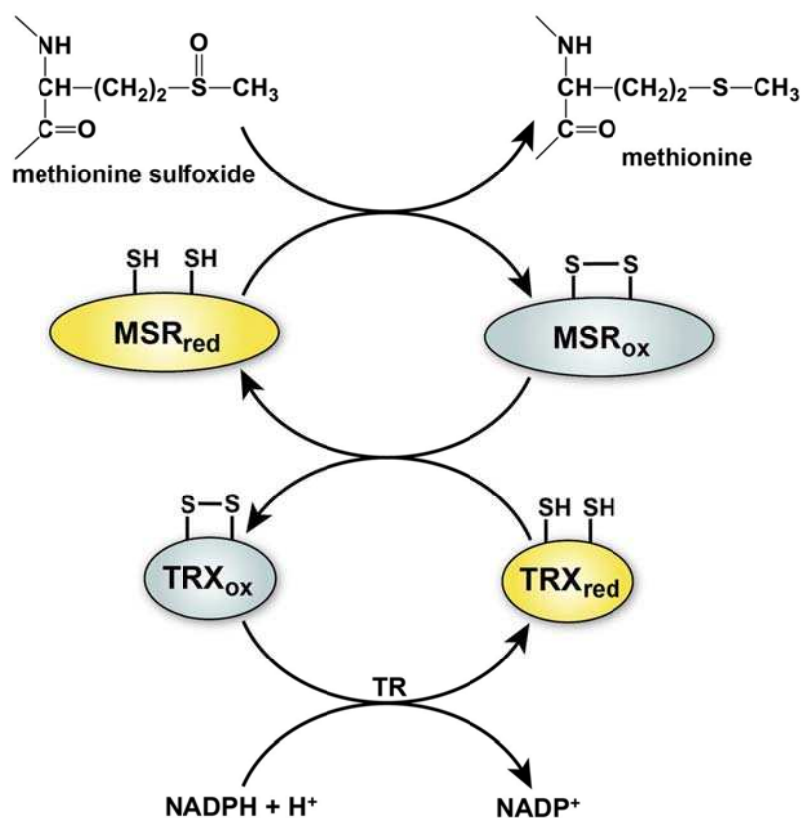


Figure 5 : Mécanisme de régénération des MSR à 2 cystéine par le système thiorédoxine (Gu *et al.*, 2015).

La réduction des méthionine sulfoxydes conduit dans le cas des MSR à 2 cystéines à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. La MSR est régénérée par une réaction d'échange dithiol/disulfure avec la TRX. La TRX est réduite à son tour par une thiorédoxine réductase (TR) au dépend par exemple du NADPH. Les formes actives réduites (red) sont représentées en jaune tandis que les formes inactives oxydées (ox) sont représentées en gris.

Des mécanismes réactionnels légèrement différents existent pour des MSR à 1 ou 3 cystéines catalytiques ainsi que pour les PRX qui utilisent également la chimie de l'acide sulfénique pour la catalyse. Dans le cas des PRXs, leur inactivation peut se produire par formation d'un acide sulfénique après réaction de l'acide sulfénique avec un deuxième peroxyde. Une protéine appelée sulfirédoxine peut réduire spécifiquement la forme acide sulfénique de certaines PRX (Biteau *et al.*, 2003).

Les GSTs font également parties de l'arsenal de défense en réponse à un stress oxydant. Elles sont capables d'une part de réduire des peroxydes de différentes molécules biologiques. De plus, les enzymes de cette famille multigéniques présentent des spécificités de substrats différentes puisqu'elles présentent des activités *in vitro* contre H₂O₂ mais aussi vis-à-vis

d'hydroperoxydes d'acides gras et d'acides nucléiques (Marrs 1996, Frova 2006). Au-delà de cette activité peroxydase, les GSTs sont capables de métaboliser des produits toxiques et très réactifs tels que le 4-hydroxynonéal, un produit issu de la peroxydation des lipides très abondant en cas de stress oxydant et impliqué dans la signalisation cellulaire (Awasthi *et al.*, 2004).

2.6. L'implication des EORs et des ENRs dans la signalisation redox

Les effets délétères des EORs et des ENRs sur la cellule ont longtemps poussé à étiqueter ces espèces en termes péjoratifs. Ces molécules étaient perçues comme le coût inévitable de la photosynthèse aérobie et de l'utilisation de l'oxygène comme accepteur d'électrons dans la respiration. Cependant, de nombreuses études ont maintenant révélé que la réactivité de ces molécules oxydantes a été mise à profit pour la transduction de signaux cellulaires. La production d'EORs et d'ENRs est même souvent génétiquement programmée. Elles sont induites pendant le développement ou en condition de stress et ont des effets complexes sur le métabolisme. L'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont d'ailleurs des messagers secondaires clés de nombreux processus de croissance cellulaire (Foreman *et al.*, 2003). Un exemple des plus caractéristiques est un mécanisme de défense connu sous le terme de « réponse hypersensible » qui a lieu lors de l'infection de cellules végétales par certaines espèces de pathogènes. Dans cette situation, la reconnaissance du pathogène, suite à une signalisation cellulaire complexe, entraîne la production massive d'EORs notamment par des NADPH oxydases et des peroxydases, un processus appelé « burst oxydatif ». Cela mène à la mort de la cellule et permet de créer localement un environnement oxydant hostile pour le pathogène. D'autre part, les EORs produits déclenchent le renforcement de la paroi cellulaire des cellules adjacentes qui peuvent ainsi mieux résister à l'infection (O'Brien *et al.*, 2012). De plus, la production d'EORs par des NADPH oxydases et des peroxydases spécialisées est utilisée pour contrôler des processus divers tels que la régulation de l'expression génique, la fermeture stomatique ou encore la croissance racinaire (Foyer *et al.*, 2005)

La modification post-traductionnelle de groupement thiols des protéines est un mécanisme canonique de signalisation redox en réponse à des oxydants. Par exemple, chez les bactéries, OxyR est un facteur de transcription comprenant deux cystéines. OxyR n'est actif que sous sa forme oxydée. Selon la nature des EORs et des ENRs, ces cystéines peuvent adopter plusieurs états d'oxydation, sulfénylation, nitrosylation, glutathionylation ou pont disulfure (Kim *et al.*, 2002). Ces différentes modifications changent l'état oligomérique

d'OxyR et confèreraient des propriétés différentes d'interaction avec l'ADN (figure 6). Cela entraîne l'activation de différents gènes antioxydants. Ce type de régulation prend donc en compte la nature et l'intensité du stress.

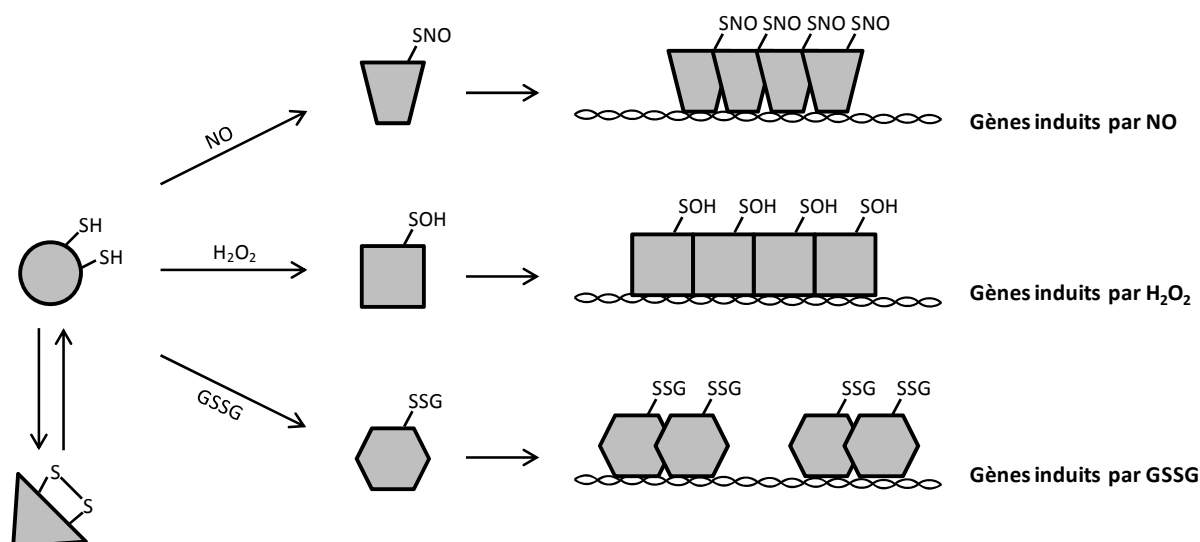


Figure 6 : Régulation par différents oxydants du facteur de transcription OxyR bactérien (Delattre *et al.*, 2005). La modification des cystéines d'OxyR dépend des EORs/ENRs et affecte de façon différente les propriétés de liaison à l'ADN et d'activation de la transcription.

Il n'est pas possible de détailler ici tous les mécanismes de signalisation redox cellulaire centrés autour des EORs et des ENRs chez les plantes. En effet, les mécanismes d'actions de ces molécules dans la signalisation cellulaire sont complexes puisqu'ils mettent en jeu plusieurs niveaux hiérarchiques comme par exemple des interactions entre cellules, le transport du signal sur de longues distances et/ou des interactions avec la signalisation effectuée par les phytohormones.

L'exemple de la régulation de la fermeture des stomates illustre ces différents aspects de la médiation de la signalisation cellulaire par les EORs et ENRs (figure 7). La perception d'un stress hydrique déclenche la biosynthèse d'acide abscissique (ABA) au niveau des cellules de garde. L'ABA induit la production d' H_2O_2 par des NADPH oxydases membranaires. L' H_2O_2 induit à son tour la production de NO par la nitrate réductase (NR) et/ou des oxyde nitrique synthases (NOS). Le NO entraîne l'ouverture de canaux calciques membranaires conduisant à une élévation de la concentration cytosolique en ion calcium Ca^{2+} . Cette concentration élevée en Ca^{2+} active des canaux chlorures entrants et inactive des canaux potassiques sortants menant à une dépolarisation de la membrane. La dépolarisation membranaire est à l'origine de l'ouverture de canaux potassiques sortant et facilite la sortie de

solutés, ce qui entraîne la plasmolyse des cellules stomatiques et donc la fermeture des stomates. D'autre part, le NO et l' H_2O_2 sont responsables de l'augmentation du niveau d'expression de certains gènes du système antioxydant par le biais de l'action de mitogen-activated protein kinases (MAPKs). Ces dernières sont également impliquées dans la modulation des signaux à l'origine de la fermeture des stomates (Neill *et al.*, 2008).

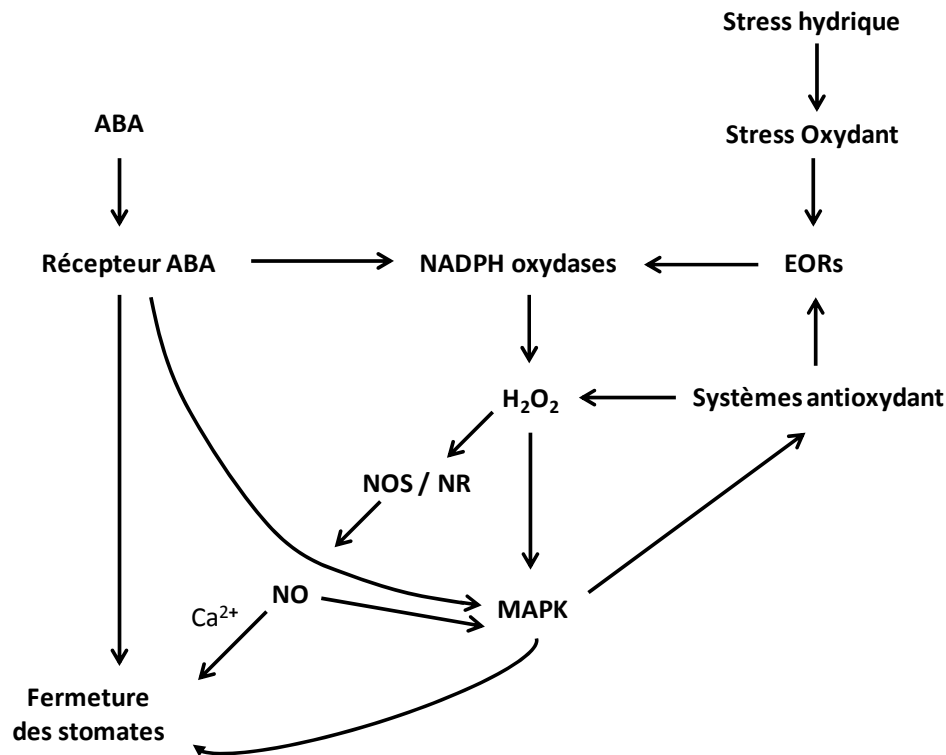


Figure 7 : Voies de signalisation provoquant la fermeture des stomates modulées par l'ABA, l' H_2O_2 , et le NO (adapté de (Neill *et al.*, 2008)). NOS : oxyde nitrique synthase ; NR : Nitrate réductase ; ABA : Acide abscissique ; MAPK : mitogen-activated protein kinases.

3. Le glutathion

3.1. Découverte

C'est en 1888 que J. de Rey-Pailhade, alors doctorant en médecine à l'université de Montpellier, a découvert un composé aux propriétés anti-oxydantes qui sera identifié, des années plus tard, comme étant le glutathion (de Rey-Pailhade 1888). Lors de ses travaux, il a mis en évidence que des extraits cellulaires de levure frais incubés avec du soufre entraînaient la formation de sulfure d'hydrogène. Comme il avait abondamment traité les levures à l'éthanol, il conclut que cette réaction n'était pas due à l'activité cellulaire mais plutôt à une substance endogène aux levures qu'il nomma *philothion* (qui aime le soufre). Il constata la même réaction à partir de nombreux tissus d'animaux d'espèces diverses ou encore à partir d'asperges fraîches. Cette présence ubiquitaire lui suggéra que le *philothion* devait avoir un rôle biologique important dans le vivant. La réactivité du *philothion* avec divers indicateurs colorés le mena à conclure que cette substance absorbe l'oxygène. D'autre part, il comprit que le *philothion* était instable et sujet aux réactions d'oxydoréduction. Il suggéra qu'il pouvait être oxydé par divers ferments et être régénéré par l'organisme aux dépens de nutriments (de Rey-Pailhade 1894). Enfin, il émit l'idée que le *philothion* contenait un hydrogène labile à l'origine de ses propriétés et décrivit ses observations par l'équation chimique suivante : $RH_2 + S \rightarrow R + H_2S$. Il ne spécifia pas la nature de R à l'époque qui a été par la suite l'objet d'une longue controverse. En effet, la nature peptidique de cette molécule a été identifiée assez rapidement. En revanche, il a été longtemps débattu pour savoir s'il s'agissait d'un dipeptide ou d'un tripeptide et de quelle nature étaient ses acides aminés. Les travaux d'Hopkins permirent en 1921 d'identifier le *philothion* comme un dipeptide composé de glutamate et de cystéine. Il décida de renommer cette molécule glutathion en vertu du glutamate qui le compose et également parce que ce nom était rémanent de l'ancien (Hopkins 1921). C'est seulement 50 ans après les premières observations de Rey-Pailhade et 15 ans après les travaux d'Hopkins que le glutathion fut définitivement identifié comme un tripeptide par synthèse chimique (Harington *et al.*, 1935). Ces informations sur la découverte du glutathion sont issues d'une revue publiée à l'occasion de l'anniversaire célébrant les 100 ans de la découverte de cette molécule (Meister 1988). Depuis lors, le glutathion a été un objet de recherche intensément étudié et bien que de nombreuses découvertes jalonnent son histoire, il continue à susciter un fort intérêt au sein de la communauté scientifique.

3.2. Structure, synthèse et régénération du glutathion

Le glutathion sous sa forme réduite est un tripeptide soluble formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il constitue la source majoritaire de thiol libre non-protéique dans les cellules animales et végétales. Celui-ci est presque ubiquitaire à tous les organismes bien que certains utilisent d'autres sources de thiols libres non-protéiques tels que le coenzyme A, le mycothiol, le bacillithiol ou l'ergothionéine (Li *et al.*, 2003). Avec l'ascorbate (vitamine C) et le tocophérol (vitamine E), le glutathion est un antioxydant cellulaire majeur contribuant fortement au contrôle de l'état redox des cellules végétales (Kunert *et al.*, 1993, Dickinson *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2004). Plusieurs états redox du glutathion coexistent. Le glutathion sous forme monomérique (appelé également glutathion réduit) (figure 8A) correspond à la forme réduite et représente a priori 98 à 99 % du pool cellulaire total. La forme oxydée principale est vraisemblablement le GSSG (figure 8B) qui forme un dimère de glutathion par l'intermédiaire d'un pont disulfure mais il existe des formes GSNO, GSOH, GS(O)SG et des formes persulfurées GSS_nH dont les concentrations ne sont pas réellement estimées.

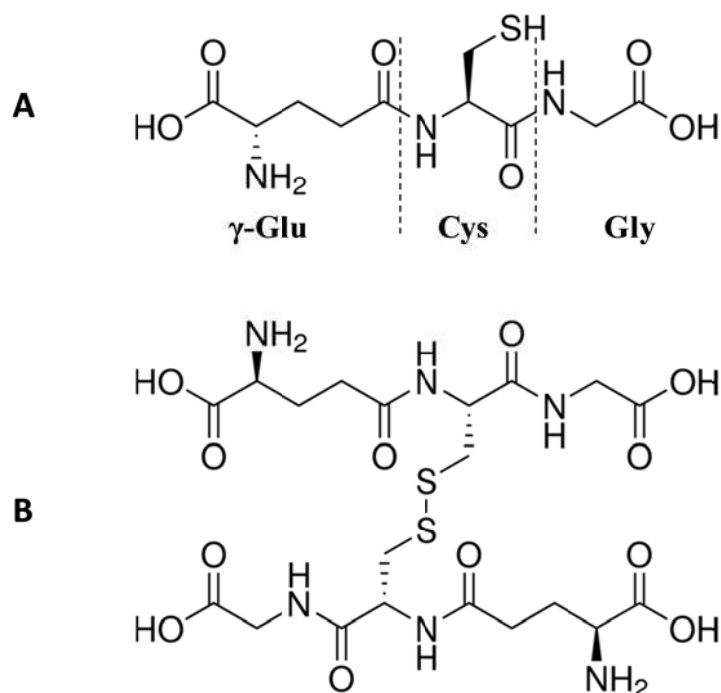


Figure 8 : GSH et GSSG. Formules développées du glutathion (A) et du disulfure de glutathion (B).

La fonction thiol présente sur la chaîne latérale de la cystéine du glutathion est à l'origine des propriétés biochimiques oxydoréductrices de ce tripeptide. Le couple 2GSH/GSSG présente à pH 7,0 un potentiel d'oxydoréduction de -240 mV (Rost *et al.*, 1964).

En conséquence, il peut être considéré, certes assez trivialement, que le GSH est un bon réducteur et le GSSG un mauvais oxydant. En tant que donneur d'électrons impliqué dans un grand nombre de réactions enzymatiques, le glutathion est un acteur impliqué dans nombre de processus physiologiques tels que la détoxification des métaux lourds ou de xénobiotiques, le métabolisme secondaire ou encore la neutralisation des espèces oxygénées réactives (Dickinson *et al.*, 2002, Rouhier *et al.*, 2008). Ces processus sont assurés par des enzymes appartenant à la superfamille des thiorédoxines (Rouhier *et al.*, 2008) telles que certaines GPXs, GSTs ou GRXs qui utilisent le GSH comme cofacteur ou substrat. Lors de ces réactions d'oxydoréduction, le GSH est oxydé en GSSG. Le GSSG est ensuite régénéré en GSH grâce à l'action de la glutathion réductase avec l'oxydation concomitante NADPH en NADP⁺ (figure 9). Cela constitue un cycle redox permettant le maintien de l'homéostasie précédemment décrite entre le GSH et le GSSG (Noctor *et al.*, 1998). Le glutathion capte le potentiel réducteur du NADPH à l'aide de la glutathion réductase ou éventuellement du système couplé thiorédoxine réductase/thiorédoxine. L'intuition de Rey-Pailhade sur la capacité du glutathion à se régénérer au détriment d'autres ferments organiques était donc avérée.

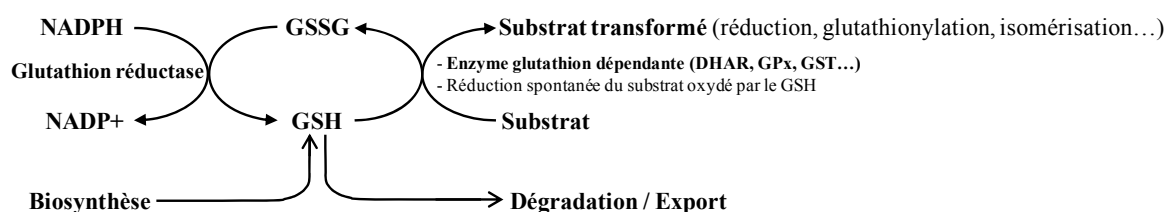


Figure 9 : Représentation schématique des relations entre la synthèse, la dégradation, l'export et la régénération du glutathion (adapté de (Noctor *et al.*, 1998)).

Le glutathion peut être dégradé, exporté à l'extérieur de la cellule ou également transféré sur des molécules (glutathionylation), jouant alors un rôle protecteur contre l'oxydation, servant « d'étiquette » permettant la reconnaissance pour l'export de la molécule ou encore servant de source de soufre dans la synthèse de métabolites. Le glutathion, conjugué ou non, peut être dégradé par le clivage de la liaison entre le γ -glutamyl et la cystéine, réaction assurée par les γ -glutamyl transpeptidases. Il peut être également dégradé par des carboxypeptidases et des phytochélatine synthases qui catalysent le clivage de la liaison entre la cystéine et la glycine (Geu-Flores *et al.*, 2009). La dégradation du glutathion est donc intimement liée au cycle métabolique et au transport des acides aminés qui le composent. D'un autre côté, la synthèse *de novo* de glutathion permet de maintenir une

concentration cellulaire constante en glutathion. Cette synthèse est un processus enzymatique en deux étapes ATP-dépendantes liées au métabolisme du glutamate, de la cystéine et de la glycine (figure 10).

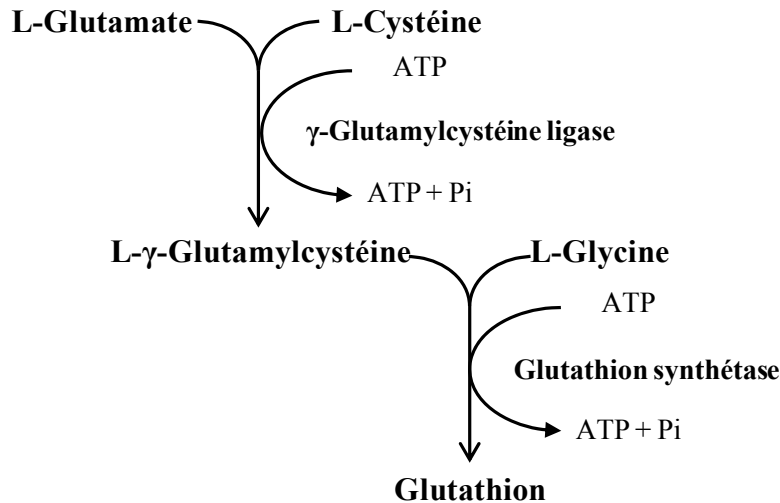


Figure 10 : Biosynthèse du glutathion. Le glutathion est formé par la condensation, en deux étapes, d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Dans une première étape, le glutamate est condensé à la cystéine par la γ -glutamylcystéine ligase puis le produit de la réaction (γ -glutamylcystéine) est condensé à la glycine par la glutathion synthétase pour donner du glutathion sous forme réduite. Ces deux étapes sont consommatrices d'énergie et nécessitent l'hydrolyse d'ATP.

Chez les organismes photosynthétiques, la première étape de synthèse se déroule dans le chloroplaste. Lors de celle-ci, un L-glutamate est condensé par sa fonction carboxylique en position gamma sur une molécule de L-cystéine pour former le dipeptide L- γ -glutamylcystéine (Meister 1988). Cette réaction est catalysée par la γ -glutamylcystéine ligase (anciennement synthétase). En raison de la liaison inhabituelle entre la cystéine et le glutamyl le glutathion est considéré comme un pseudo-peptide. Cette liaison confère au glutathion un caractère réfractaire à la dégradation par les peptidases cellulaires standards à l'exception spécifique de la γ -glutamyltransférase, une aminopeptidase impliquée dans le transport et le métabolisme des acides aminés (Meister *et al.*, 1981). Ensuite, lors de la seconde étape qui a lieu dans le chloroplaste ou le cytosol chez les organismes photosynthétiques, le γ -glutamylcystéine est condensé sur une L-glycine. Cette réaction est catalysée par la glutathion synthétase, une enzyme homodimérique. En raison du rôle capital du glutathion, l'expression des enzymes responsables de la synthèse et de la régénération du glutathion est finement régulée afin de conserver d'une part un ratio GSH/GSSG stable et d'autre part une concentration cellulaire en glutathion constante.

3.3. La signalisation et les fonctions du glutathion

Des études portant sur les variations du pool cellulaire de glutathion ou des variations du ratio GSH/GSSG ont mis en évidence l'implication de cette molécule dans divers processus tels que le cycle cellulaire (Vernoux *et al.*, 2000), la différenciation cellulaire (Henmi *et al.*, 2005), l'apoptose ou encore la résistance aux pathogènes (Mou *et al.*, 2003, Foyer *et al.*, 2005). En condition standard, la concentration du GSH dans les cellules végétales est classiquement de l'ordre de 2 à 5 mM tandis que celle du GSSG est de l'ordre du nM (Foyer *et al.*, 2009). Le ratio GSH/GSSG est donc au moins égal à 10^6 . De plus, étant donné l'abondance du GSH, le potentiel redox de ce couple (≈ -300 mV) impacte fortement le potentiel redox cellulaire. Un stress peut entraîner une augmentation et une diminution respective de la concentration cellulaire en GSSG et en GSH et donc du ratio GSH/GSSG, pouvant modifier le potentiel redox du couple GSH/GSSG d'environ 90 mV. Ce changement serait suffisant pour permettre la signalisation redox thiol-dépendante en favorisant l'oxydation de certains thiols (Foyer *et al.*, 2009). Ce rôle de senseur redox du glutathion est important car son statut redox est lié à celui d'autres tampons redox majeurs tels que l'ascorbate par le cycle ascorbate-glutathion. Les mécanismes moléculaires restent néanmoins à être déterminés précisément car de bas niveaux cellulaires de glutathion peuvent affecter le fonctionnement correct de protéines dépendantes de cette molécule ou altérer l'activité de protéines régulées par la glutathionylation/déglutathionylation (Rouhier *et al.*, 2008).

Le glutathion est également impliqué dans la métabolisation de molécules toxiques endogènes ou exogènes. Les glutathion transférases catalysent la conjugaison du glutathion sur ces molécules toxiques. De par sa nature électrophile, le glutathion décroît le caractère lipophile empêchant la diffusion passive à travers les membranes de certaines de ces molécules et il constitue une étiquette signalant les molécules à éliminer. En effet, la glutathionylation de ces molécules permet leur reconnaissance et leur transport par des transporteurs transmembranaires de type ABC (ATP Binding Cassette). Ces derniers catalysent leur internalisation dans la vacuole ou leur export dans l'apoplasme où leur caractère toxique n'est plus problématique.

Les fonctions thiols des protéines peuvent également être sujettes à la glutathionylation. Cette modification post-traductionnelle réversible se produirait spontanément en présence de GSSG ou de GSNO mais également par réaction d'une molécule de GSH avec un acide sulfénique formé en présence d'agent oxydant. Il est

également possible que les GRXs assurent la glutathionylation de protéines bien que les exemples soient rares (Nulton-Persson *et al.*, 2003, Bender *et al.*, 2015). En conséquence, cette réaction est plus fréquente en condition de stress oxydant et pourrait permettre de protéger les cystéines contre l'oxydation irréversible en acides sulfiniques ou sulfoniques. De plus, la glutathionylation représente un intermédiaire réactionnel comme c'est le cas pour certaines PRXs et MSRs régénérées par un système GSH/GRX (Noguera-Mazon *et al.*, 2006). Enfin, cette modification est vraisemblablement un moyen de réguler positivement ou négativement l'activité de certaines protéines. En effet, certaines enzymes telles que l'isocitrate lyase ou la triose-phosphate isomérase sont inactivées par glutathionylation (Noguera-Mazon *et al.*, 2006, Bedhomme *et al.*, 2009).

Au-delà de ces fonctions dans la signalisation cellulaire et la détoxication, le GSH est utilisé pour synthétiser la phytochélatine, un agent de chélation des métaux et des métalloïdes participant à la tolérance des plantes aux ions métalliques (Grill *et al.*, 1989). La phytochélatine est un polymère avec le motif structural (Glu-Cys)_n-Gly ($2 \leq n \leq 11$) synthétisé par la dipeptidyltransférase à partir du GSH (figure 11) (Beck *et al.*, 2003). Cette molécule peut lier les ions métalliques via les thiols des cystéines, neutralisant ainsi le caractère toxique des ions métalliques. Le complexe métal-phytochélatine est ensuite importé dans la vacuole à l'aide de transporteurs ABCs. La molécule de phytochélatine est alors clivée en acides aminés et les ions métalliques sont chélatés par des acides organiques.

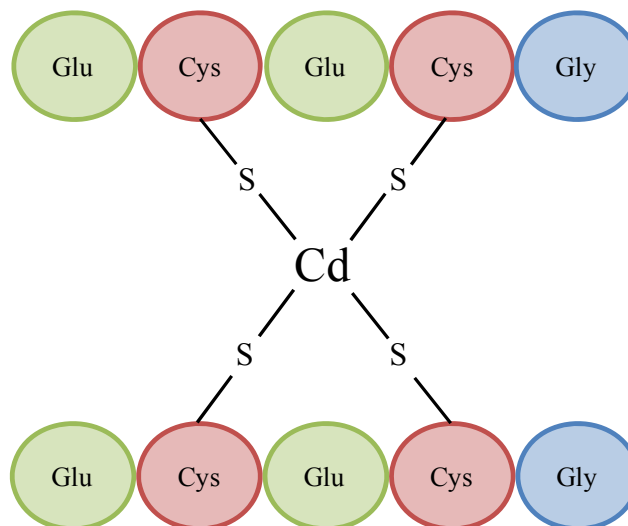


Figure 11 : Représentation schématique de la chélation d'un atome de cadmium par deux molécules de phytochélatines. L'atome de cadmium est chélaté par les fonctions thiol des cystéines.

4. Les glutathion transférases

4.1. Les GSTs, des enzymes de la superfamille des thiorédoxines

Les protéines de la superfamille des thiorédoxines peuvent être définies comme des enzymes possédant au moins un domaine protéique présentant le repliement thiorédoxine. Ce repliement est composé d'environ 80 acides aminés et se caractérise structuralement par un cœur de 4 brins β pris en sandwich par 3 hélices α s'agencant selon un motif $\beta 1 \alpha 1 \beta 2 \alpha 2 \beta 3 \beta 4 \alpha 3$ (figure 12) (Holmgren *et al.*, 1975). En dépit de son nom, le repliement thiorédoxine est généralement plus court d'un brin β et d'une hélice α qu'une thiorédoxine eucaryote classique. Une particularité commune à cette superfamille est la présence d'une proline conservée en configuration *cis* située avant le brin $\beta 3$. Cette configuration *cis* est rare pour la proline et a une incidence structurale puisqu'elle induit la formation d'un coude nécessaire à la configuration tridimensionnelle du repliement thiorédoxine. Une autre caractéristique récurrente des protéines à repliement thiorédoxine est le positionnement du site actif en amont de l'hélice $\alpha 1$ (Martin 1995).

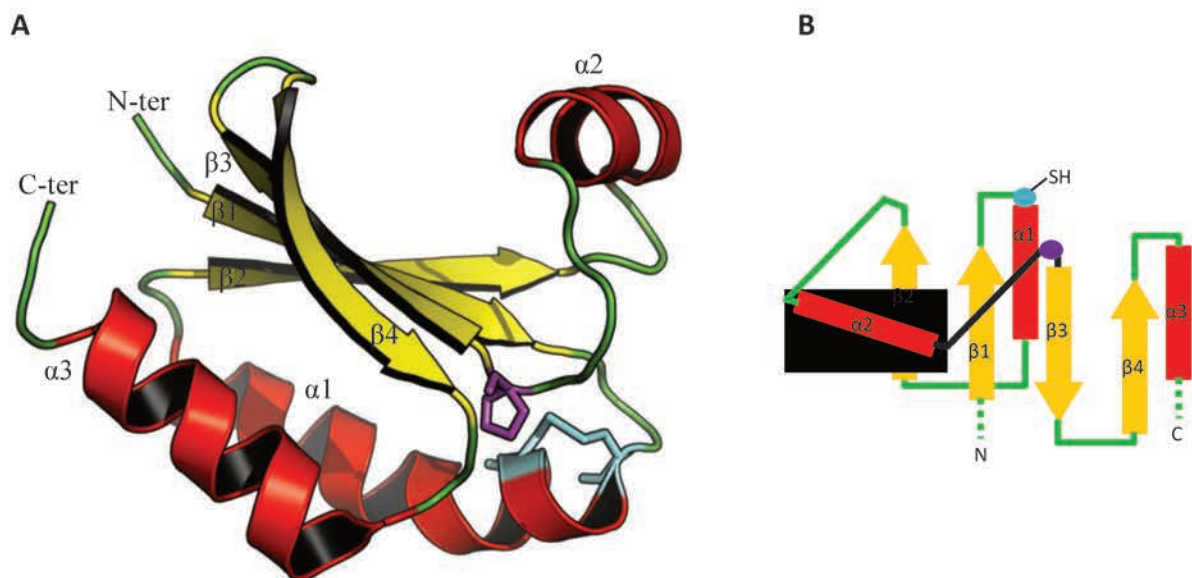


Figure 12 : Motif thiorédoxine. (A) Représentation en mode ruban et flèche (visualisation des hélices alpha et brins bêta respectivement sous la forme d'hélices rouges et de flèches jaunes) de la structure 3D du repliement thiorédoxine de la TrxH4 de *Populus trichocarpa* sous sa forme oxydée. Les extrémités N et C-terminales ainsi que les éléments de structure secondaire sont annotés. Un premier brin β et une première hélice α situés en position N-terminale du brin $\beta 1$ ont été supprimés pour ne laisser apparaître que le repliement thiorédoxine. Les deux cystéines du motif catalytique CxxC de la TrxH4 sont représentées en cyan et la proline en configuration *cis* en magenta (code PDB : 2LKU) (Koh *et al.*, 2008). (B) Diagramme topologique du repliement thiorédoxine. Les hélices α , les brins β , les deux cystéines du motif catalytique et la *cis*-proline ont été représentés selon le même code couleur qu'en (A).

Il existe dans le vivant un grand nombre de fonctions protéiques pour un relativement petit nombre de repliements protéiques. L'étude de nombreuses superfamilles a montré que la nature a su générer au cours de l'évolution de la diversité fonctionnelle à partir de variations autour d'un repliement protéique. Ainsi, la superfamille des TRXs comprend plusieurs familles multigéniques comme les thiorédoxines elles-mêmes mais aussi les glutathion peroxydases, les glutarédoxines, les protéine disulfure isomérases, ou encore les glutathion transférases (tableau 2).

Famille multigénique	Fonction	Motif catalytique typique
Thioredoxine (TRX)	Réduction ponts disulfures dans les molécules protéiques	CxxC
Glutathione peroxydase (GPX)	Réduction d'hydroperoxydes	C/UGLT
Disulfide bond A (DSBA)	Formation de pont disulfure dans les protéines	CPH/FC
Arséniate réductase (ArsC)	Réduction de l'arséniate	CxxC/S
Glutaredoxine (GRX)	Réduction ponts disulfures dans les molécules protéiques ; déglutathionylation de protéines	CxxC/S
Glutathion transferase (GST)	Glutathionylation et déglutathionylation de petites molécules ; Réduction d'hydropéroxydes organiques	Très variable
Protéine Sco	Liaison des ions cuivres ; Oxydoréduction des thiols/disulfures	CPDIC
Protéine disulfure isomérase (PDI)	Formation de pont disulfure dans les protéines	CGHC

Tableau 2 : Fonctions biochimiques des principales familles multigéniques composant la superfamille des thiorédoxines. Les motifs catalytiques typiques sont indiqués selon le code monolettre des acides aminés où x représente un acide aminé variable.

La diversification des fonctions catalytiques au sein de cette famille provient d'une part des variations locales de séquences, en particulier au niveau du site actif ou des sites de liaison des substrats. Ce motif est classiquement de type WCGPC pour les TRXs mais une analyse globale des différentes familles multigéniques à repliement thiorédoxine a montré que ce motif était conservé seulement pour 55,8 % des isoformes (Atkinson *et al.*, 2009). Ainsi, en dépit de leur relation structurale, ces protéines accomplissent quelquefois des fonctions catalytiques distinctes. En général, elles sont impliquées dans la formation, la réduction ou l'isomérisation des ponts disulfure mais certaines (GSTs, GPXs, ARSCs, SCOs) ont des fonctions particulières comme la détoxification de xénobiotiques ou la réduction de peroxydes

ou la réduction/séquestration de métaux pour n'en citer que quelques-unes. D'autre part, des variations structurales (remaniements structuraux et/ou acquisition de nouveaux domaines protéiques) sont également à l'origine de cette diversité fonctionnelle. Ce phénomène est visible sur la figure 13 où les éléments structuraux additionnels au repliement thiorédoxine sont représentés en bleu.

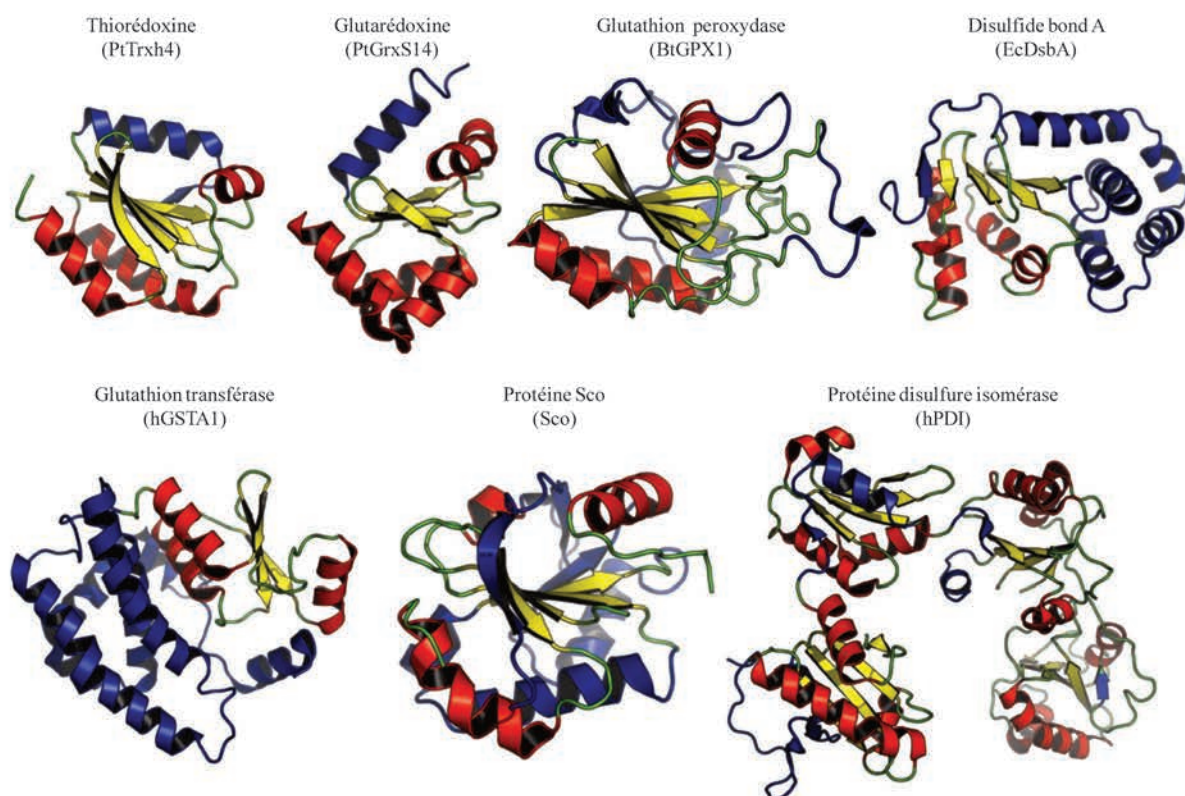


Figure 13 : Variations autour du motif thiorédoxine. Les structures tridimensionnelles de monomères de grands représentants des familles multigéniques de la superfamille des thiorédoxines sont représentées. Le repliement thiorédoxine est en rouge et jaune selon le code couleur utilisé dans la figure précédente et les éléments structuraux additionnels sont colorés en bleu. Les structures des protéines suivantes ont été utilisées : PtTrxh4 (code PDB : 3D21) (Koh *et al.*, 2008) ; PtGrxS14 (code PDB : 2LKU) (Wang *et al.*, 2014) ; BtGPX1 (code PDB : 1GP1) (Epp *et al.*, 1983) ; EcDsbA (code PDB : 1A2L) (Guddat *et al.*, 1998) ; hGSTA1 (code PDB : 2R6K) (Achilonu *et al.*, 2010) ; Sco (code PDB : 4BPY) (Katie *et al.*, 2014) ; hPDI (code PDB : 4EKZ) (Wang *et al.*, 2013).

Ces différences sont plus ou moins importantes et consistent par exemple en l'ajout d'une hélice α en position N-terminale pour la GrxS14 de peuplier, en de complexes remaniements des structures secondaires comme pour les protéines Sco ou GPX1, en l'ajout d'un domaine protéique comme dans le cas des GSTs ou DsbAs ou encore en la répétition du repliement thiorédoxine comme c'est le cas pour de nombreuses PDIs. Ces modifications sont clairement indispensables aux nouvelles fonctions de ces protéines. Par exemple, celui des

GSTs, enzymes dont il est question ici, offre un site de liaison d'un substrat nécessaire à sa catalyse.

4.2. Les grands types de GSTs

La famille multigénique des glutathion transférases (EC2.5.1.18), anciennement appelées glutathion S-transférases, est présente dans les trois domaines du vivant. Cette présence ubiquitaire semble en faveur d'une origine sans doute très ancienne de ces enzymes ainsi que des fonctions fondamentales conservées au cours de l'évolution. Dans la littérature, trois familles principales de GST ont souvent été définies. Il s'agit des GSTs cytosoliques ou solubles, des GSTs Kappa, également solubles et identifiées dans les mitochondries et les peroxysomes et des GSTs microsomaux constituant la famille des MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoids and Glutathione metabolism). Ces différents groupes sont considérés comme des GSTs en raison de leur capacité enzymatique à conjuguer le glutathion mais leurs structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire, leur localisation subcellulaire peuvent varier considérablement (Hayes *et al.*, 2005). Les caractéristiques biochimiques et structurales des 3 familles majeures de GSTs sont détaillées ci-dessous et résumées dans le tableau 3 et la figure 14. Une autre famille de GSTs retrouvée chez certaines bactéries et contenant du manganèse est responsable de la résistance à l'antibiotique fosfomycine (FosA). Les caractéristiques de ces GSTs plasmidiales ne seront pas détaillées ici en raison de leurs présences restreintes à certains procaryotes.

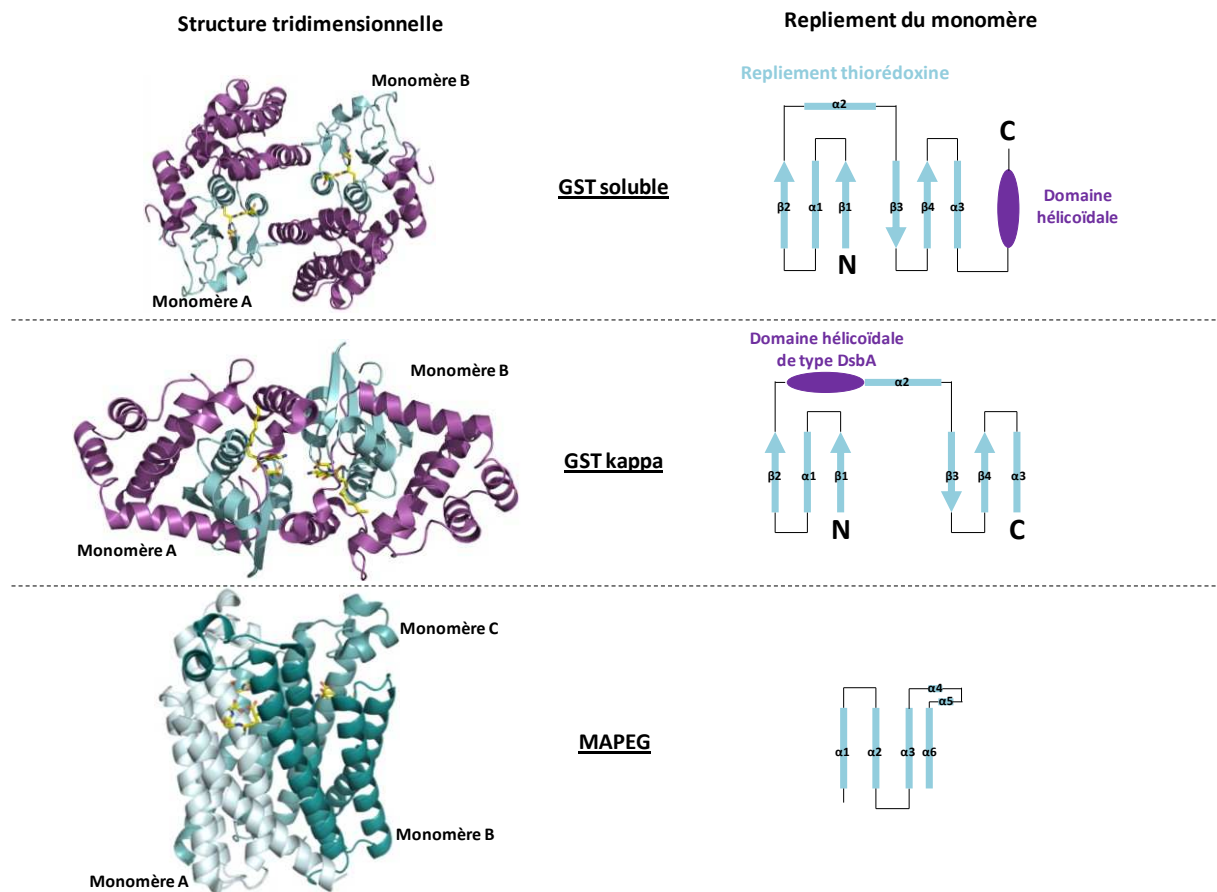


Figure 14 : Organisation tridimensionnelle des trois grandes familles de GSTs. Les motifs thiorédoxines et hélicoïdaux sont représentés respectivement en cyan et en magenta pour les GSTs solubles (GST oméga humaine, code PDB : 1EEM (Board *et al.*, 2000)) et kappa (GST kappa humaine, code PDB : 3RPN (Wang *et al.*, 2011)). Pour la MAPEG (MAPEG humaine, code PDB : 4AL0 (Sjogren *et al.*, 2013)) chaque monomère est représenté dans une nuance de cyan différente. Les GSTs solubles présentent une forme globulaire alors que celle des GSTs kappa est plus allongée. Ces protéines sont dimériques et possèdent un motif thiorédoxine et un domaine hélicoïdal. Ce dernier est soit en position C-terminale pour les GST solubles ou inséré au sein du motif thiorédoxine pour les GST kappa. Les MAPEGs sont quant à elles trimériques et ne présentent pas de motif thiorédoxine. Dans le site actif, le glutathion (GST soluble, MAPEG) et l'hexyl-glutathion (GST kappa) sont représentés en jaune en mode bâton.

	MAPEG	Kappa	GST soluble
Etat oligomérique	Homotrimérique	homodimérique	Généralement dimérique, parfois monomérique
Localisation subcellulaire	Membrane	Mitochondrie, parfois peroxysomale	Cytoplasme, membrane, chloropaste, peroxysome, mitochondrie, noyau...
Organisation protéique 3D	Un domaine au repliement analogue au cytochrome c oxydases	Un domaine de type thiorédoxine au sein duquel est inséré un domaine hélicoïdal de type Dsba	Un domaine de type thiorédoxine auquel est fusionné en C-Ter un domaine hélicoïdal
Nombre de gènes dans les organismes photosynthétiques	Quelques gènes (généralement un ou deux)	?	Plusieurs dizaine de gènes répartis en différentes classes
Fonctions biochimiques	- Glutathion transférase - Glutathion peroxydase - Isomérase	- Glutathion transférase - Glutathion peroxydase	- Glutathion transférase - Glutathion peroxydase - Isomérase - Thiol réductase - Propriété ligandine
Rôle cellulaire	Intervient dans la voie de synthèse des prostaglandines	Interviendrait dans le métabolisme lipidique et énergétique	Extrêmement variés, souvent équivoques

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des trois grandes familles multigéniques de GSTs.

4.2.1. Les MAPEGs

Les MAPEGs, anciennement appelées GSTs microsomales, sont structuralement très différentes des GSTs kappa et des GSTs solubles. En effet, chez les mammifères, ces enzymes forment des homotrimères transmembranaires où chaque monomère constitué uniquement d'hélices α peut fixer un glutathion (Holm *et al.*, 2006, Molina *et al.*, 2007). Ces protéines ne présentent pas de repliement thiorédoxine comme c'est le cas pour les GSTs solubles et kappa. En revanche, l'organisation tridimensionnelle des MAPEGs est analogue à la sous-unité 1 des cytochrome c oxydases (Niegowski *et al.*, 2014). Probablement en raison de leurs rôles essentiels, les MAPEGs sont ubiquitaires chez les eucaryotes et les procaryotes (Jakobsson *et al.*, 2000). Cette famille a été séparée en cinq classes phylogénétiques : les classes 1, 2, 3 nommées d'après les différents gènes humains ; la classe bactérienne B1 ; la classe cyanobactérienne B2 (Frova 2006). La classe 1 comporte les sous-classes MGST1 et PGES1 et la classes 2 les sous-classes MGST2, LTC4S et FLAP. Chez les organismes photosynthétiques, un seul gène appartenant toujours à la classe 3 est généralement exprimé (Frova 2006). Les MAPEGs de classe 3 sont généralement impliquées dans la synthèse des leucotriènes et des prostaglandines, tous deux des eicosanoïdes. Ces enzymes catalysent des réactions de type transférase, peroxydase ou isomérase dépendantes du glutathion. A titre d'exemple, la MAPEG humaine de la classe 3 (MGST3) catalyse la conjugaison du glutathion sur le leucotriène A4 pour produire du leucotriène C4 et peut également réduire les lipides

peroxydés (Jakobsson *et al.*, 1997). Les MAPEGs des organismes photosynthétiques n'ont peu ou pas été étudiées à ce jour et leur fonction n'est pas connue.

4.2.2. Les GSTs kappa

Les GSTs kappa possèdent comme les GSTs solubles un domaine à repliement thiorédoxine ainsi qu'un domaine exclusivement composé d'hélice. Dans les GSTs solubles le domaine hélicoïdal est en position C-terminale tandis que dans les GSTs kappa celui-ci est inséré entre l'hélice $\alpha 2$ et le brin $\beta 3$ comme c'est également le cas pour les protéines DsbAs ou GPXs (figure 14) (Morel *et al.*, 2011). Le domaine hélicoïdal des GSTs kappa présente d'ailleurs plus d'homologie de séquence avec le domaine hélicoïdal des DsbAs que celui des GSTs solubles (Ladner *et al.*, 2004). Néanmoins, tout comme les GSTs solubles, ces protéines sont dimériques et possèdent des activités peroxydase et de conjugaison du glutathion. Cette famille de GST est très ancienne d'un point de vue évolutif et des orthologues relativement conservés sont retrouvés chez les procaryotes et la plupart des eucaryotes hormis les plantes. Elles sont quelquefois appelées GSTs mitochondriales en raison de leur localisation subcellulaire mais ce nom n'est pas adapté puisqu'elles présentent aussi souvent une localisation peroxysomale (Jowsey *et al.*, 2003, Moons 2005, Raza 2011). Ces deux compartiments subcellulaires sont le siège du catabolisme des acides gras par β -oxydation. Pour cette raison il est souvent considéré que le rôle de ces enzymes est lié à ce processus, possiblement dans la détoxification de lipides peroxydés étant donné leur activité catalytique. Aucune n'a été identifiée dans le cytosol jusqu'à maintenant. Des expériences d'extinction de gènes chez le ver *Caenorhabditis elegans* ont confirmé l'implication des GSTs kappa dans le métabolisme lipidique mais aussi énergétique, l'extinction génique entraînant une diminution du taux respiratoire et de la concentration de l'acide *cis*-vaccénique (Petit *et al.*, 2009). Les mécanismes moléculaires précis dans lesquels ces GSTs sont impliquées restent toutefois incertains.

4.2.3. Les GSTs cytosoliques

D'une manière générale, les GSTs cytosoliques catalysent la conjugaison du glutathion sur un large éventail de molécules électrophiles, hydrophobes et souvent cytotoxiques d'origine interne ou externe au métabolisme (Hayes *et al.*, 2005). Bien qu'aucune enzyme n'ait été identifiée lors des premières études, cette activité de transfert du glutathion a été découverte au début des années 60 sur des extraits cytosoliques de cellules de foie de rat incubés avec la sulfobromophtaléine, des chloro-nitrobenzènes ou des molécules

aromatiques halogénées (Booth *et al.*, 1961, Combes *et al.*, 1961). L'observation de cette activité transférase à partir d'extraits de foie n'est pas surprenante puisque dans certaines conditions de stress, les GSTs peuvent constituer jusqu'à 20% des enzymes hépatiques de rat (Parke 1975). Chez les plantes, les GSTs ont été mises en évidence en 1970 suite à la découverte d'une activité enzymatique de glutathionylation chez le sorgho sur l'herbicide atrazine (Lamoureux *et al.*, 1970). La même année une GST soluble capable de conjuguer du glutathion réduit sur différents dérivés triazines a été partiellement purifiée à partir d'extraits de maïs (Frear *et al.*, 1970). L'intérêt porté aux GSTs de plantes a été très limité dans les années 1970 puis a explosé au milieu des années 1980. En effet, des compagnies agro-industrielles telles que Monsanto et Syngenta ont fortement étudié les propriétés enzymatiques des GSTs de plantes céréalières en raison de leurs aptitudes à détoxiquer les herbicides. Cependant, aucune semence génétiquement modifiée mettant à profit les propriétés des GSTs n'a été commercialisée à ce jour. Il est notamment ressorti de ces études que les plantes céréalières sont plus résistantes aux herbicides que leurs adventices du fait de niveaux d'expression génique et d'activités constitutives de GSTs considérablement plus élevés. Vers la fin des années 1990, il apparaît que les GSTs sont fortement induites en réponse à de très nombreux stress de type biotiques et abiotiques suggérant des rôles cellulaires endogènes dans le métabolisme primaire et secondaire, la tolérance aux stress ou encore la signalisation cellulaire, outrepassant la détoxification de xénobiotiques. D'ailleurs, bien que la plupart des GSTs cytosoliques soient effectivement localisées dans le cytoplasme, cette appellation est devenue quelque peu désuète puisque des isoformes ont été identifiées dans presque tous les autres compartiments subcellulaires. En dépit de toutes ces évidences, les fonctions biochimiques et physiologiques précises de ces protéines restent en grande partie mystérieuse. Cela est d'autant plus surprenant au regard du nombre croissant d'études portant sur les GSTs de plantes (figure 15).

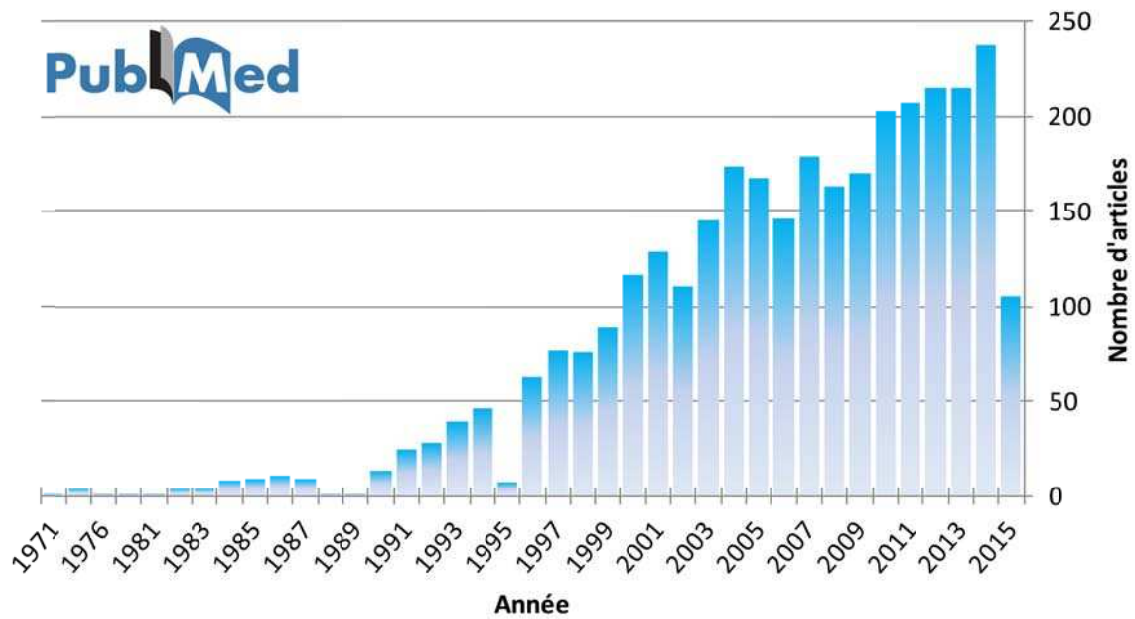


Figure 15 : Nombre de publications scientifiques recensées par année sur PubMed contenant les termes de recherche « plants glutathione transferases ».

En conclusion, il semble que la capacité enzymatique à transférer le glutathion, commune à ces trois grandes familles, représente une convergence fonctionnelle évolutive. Dans les pages suivantes je dresserai un état de l'art des connaissances actuelles portant sur la phylogénie, l'évolution, les propriétés structurales et enzymatique des GSTs dites solubles ou canoniques de plantes.

4.3. Phylogénie des GSTs canoniques de plantes

La phylogénie et la classification des GSTs de plantes ont évolué avec l'augmentation du nombre de séquences identifiées et l'essor des ressources génomiques. Initialement découvertes chez le rat, les GSTs ont été principalement caractérisées chez les mammifères puis ultérieurement chez les insectes, les plantes et les bactéries. Les GSTs de mammifères ont été regroupées dans des classes bien définies et homogènes tandis que par opposition les GSTs des autres organismes ont été réunies au sein de la classe thêta (Buetler *et al.*, 1992). Avec la multiplication de la caractérisation des GSTs de plantes, une nouvelle classification a été proposée séparant les GSTs de plantes en trois classes nommées type I, II et III. Cette classification était basée sur l'analogie des séquences et la structure des gènes (enchaînement introns/exons) (Droog *et al.*, 1995, Droog 1997). Le séquençage du génome d'*A. thaliana* ainsi que celui d'autres plantes a permis de recenser systématiquement tous les gènes de GST solubles et d'établir une classification phylogénique plus fine encore utilisée à ce jour.

La première analyse exhaustive des gènes de GSTs dans le génome d'*A. thaliana* a conduit à l'identification d'une cinquantaine de gènes codant des GSTs (Dixon *et al.*, 2002). Les deux classes comprenant le plus d'isoformes ont été nommées Phi (F) et Tau (U), la classe Phi remplaçant les GSTs de type I. Les auteurs ont également regroupé ces séquences de GSTs solubles au sein des trois autres classes lambda, zêta et thêta (Dixon *et al.*, 2002). Ce système de classification est une extension de celui préexistant utilisé chez les animaux. Les gènes sont désignés par un code de deux lettres pour l'identification de l'espèce, des lettres GST, suivies d'une lettre grecque désignant la classe et d'un nombre permettant de distinguer les membres de la même classe (Dixon *et al.*, 2002). Ainsi l'isoforme 1 de classe Phi d'*A. thaliana* est désignée par AtGSTF1. Le séquençage de nombreux génomes dans les années qui suivirent ont permis d'identifier un nombre considérable de séquences de GSTs. A l'heure actuelle, plus de 13 000 séquences non redondantes sont recensées dans la biosphère (Mashiyama *et al.*, 2014). Les dernières analyses génomiques et phylogéniques ont conduit au regroupement des GSTs des organismes photosynthétiques en quatorze classes : phi (F), tau (U), thêta (T), zêta (Z), lambda (L), hémerythrine (H), iota (I), ure2p, glutathionyl-hydroquinone réductase (GHR), facteur d'élongation gamma 1B (EF1B γ), déhydroascorbate réductase (DHAR), déhalogenase tétra-chlorohydroquinone (TCHQD), métaxine, microsomale prostaglandine synthase type2 (mPGES-2) (figure 16) (Lallement et al, 2014a).

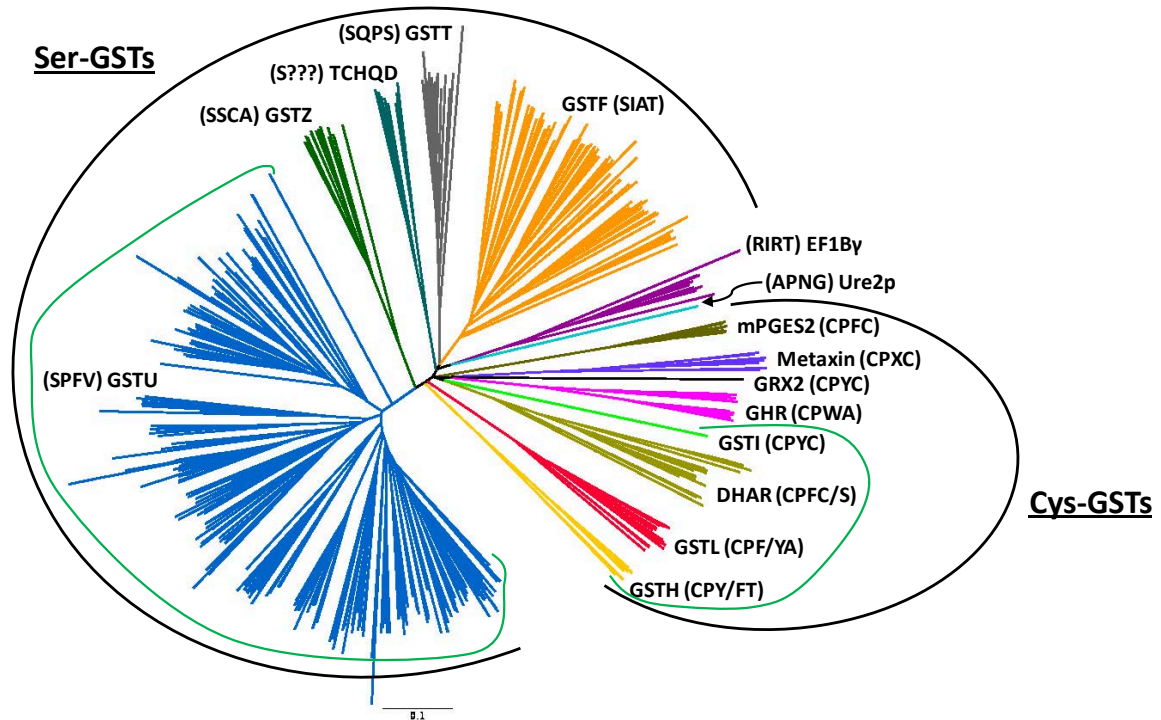


Figure 16 : Arbre phylogénétique enraciné des GST de plantes (adapté de (Lallement *et al.*, 2014)). Les séquences de GSTs identifiées chez *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens*, *Pinus tabulaeformis*, *Populus trichocarpa* et *Solanum lycopersicum* ont été utilisées pour construire cet arbre. Cet arbre a été construit à partir de l'algorithme BioNJ. L'échelle représente 0,1 substitution par résidu. Les classes ont été annotées et celles spécifiques aux organismes photosynthétiques sont cerclées de vert. Les classes avec une sérine et cystéine catalytique sont indiquées.

Les GSTs d'une même classe partagent au moins 40% d'identité de séquence alors qu'en deçà de 20%, elles appartiennent à des classes différentes. Si ces pourcentages d'identité sont compris entre 20 et 40%, d'autres critères tels que la structure des gènes (position des introns et des exons), les propriétés immunologiques et les activités enzymatiques sont pris en compte. Certaines classes peuvent être retrouvées au sein de plusieurs règnes comme les classes Zêta ou les Thêta alors que les classes Lambda, Tau et DHARs sont spécifiques aux plantes. Les GSTs de la classe Phi sont présentées comme spécifiques au règne végétale dans la littérature mais des séquences proches ont été identifiées chez certains champignons (Morel *et al.*, 2013). Les classes de GSTs sont composées en général de 1 à 5 membres à l'exception des classes Phi et Tau qui comptent un bien plus grand nombre de gènes. Par exemple, le génome du peuplier (*Populus trichocarpa*) compte au moins 81 gènes de GSTs dont 53 Tau et 8 Phi. Ces deux classes représentent à elles seules près de 75% des isoformes de cette famille (Lan *et al.*, 2009). Cependant, le degré d'homologie entre deux GSTUs ou GSTFs peut varier considérablement comme par exemple

dans le cas des GSTUs du riz où l'identité de séquence entre deux isoformes peut varier de 17 à 98% (Soranzo *et al.*, 2004). D'après l'arbre phylogénétique de la figure 16, les classes Phi et Tau sont composées chacune d'au moins trois clades qui pourraient correspondre à des sous-classes. Cependant, des différences fonctionnelles entre ces clades restent à être découvertes pour réaliser un découpage phylogénétique plus fin. En général, les classes de GSTs spécifiques à un règne comportent bien plus d'isoformes que les classes retrouvées dans plusieurs règnes. Elles sont généralement impliquées dans des mécanismes moléculaires permettant de faire face à des contraintes environnementales spécifiques à ce règne. A cet égard, comme il le sera détaillé ultérieurement, les classes Phi et Tau sont impliquées dans la détoxification des nombreuses substances toxiques auxquelles les plantes doivent faire face.

Sur la base de la nature du résidu catalytique les GSTs canoniques de plantes peuvent être séparées en deux grands groupes (figure 16). Les classes Tau, Phi, Zêta, Thêta et TCHQD présentent une sérine catalytique. La nature du résidu catalytique pour les classes EF1B γ et Ure2p n'est pas encore bien définie. Enfin les sept classes restantes à savoir les classes Lambda, Iota, DHAR, GHR, mPGES-2, métaxine, hémérythrine présentent une cystéine catalytique. Cette distinction est importante puisque, comme nous le verrons plus tard, la nature du résidu catalytique détermine la nature des réactions catalysées par les GSTs.

4.4. Organisation génomique et modèle évolutif des glutathion transférases solubles

Suite au séquençage de nombreux génomes d'organismes photosynthétiques, des cartes chromosomiques de la distribution des GSTs ont été construites. L'analyse de ces cartes a montré que la plupart des gènes de GSTs de la même classe forment des clusters compacts. Chez le peuplier, sur les 81 gènes de GSTs, 41 sont retrouvés au sein de 7 principaux clusters de gènes (figure 17) (Lan *et al.*, 2009). D'autre part chez le riz, 46 des 61 gènes sont présents dans des clusters alors que seulement 15 gènes sont trouvés au niveau de *loci* isolés (Soranzo *et al.*, 2004). Parmi ces clusters, le plus important est constitué par 23 gènes de la classe Tau et un cluster est constitué par 8 gènes de GST de la classe Phi (Soranzo *et al.*, 2004).

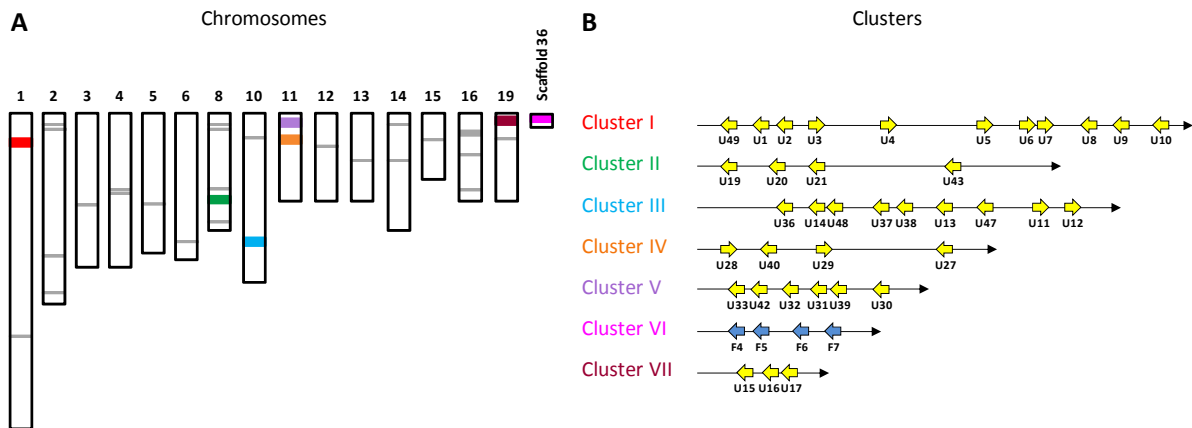


Figure 17 : Localisation chromosomique et arrangement des clusters de gènes de GSTs Tau et Phi chez le peuplier *Populus trichocarpa* (adapté de (Lan *et al.*, 2009)). (A) Localisation des gènes codant des GSTs sur les chromosomes du peuplier. Les barres colorées se rapportent aux clusters de GSTUs et GSTFs représentés en B alors que les barres grises matérialisent les *loci* isolés pour les autres GSTs. (B) Représentation des 7 principaux clusters de gènes codant les GSTs Tau (U) et Phi (F). Les flèches indiquent le sens de la séquence codante et les couleurs jaunes et bleues représentent respectivement les gènes des classes Tau et Phi. Les différentes isoformes sont annotées.

Cette organisation quasi systématique traduit des événements de duplication successifs à l'origine de l'explosion du nombre de copies de gènes. En effet, les théories évolutives stipulent que les familles multigéniques proviennent de la duplication d'un ou de plusieurs gènes (Ohta 2000). Une fois dupliquées, les nouvelles copies géniques sont affranchies de la pression évolutive ce qui permet une diversification structurale et fonctionnelle via des mutations et des recombinaisons génétiques. Une des conséquences de ce mode évolutif de duplication est la redondance fonctionnelle entre gènes d'une même famille multigénique. Cette redondance rend difficile la caractérisation des fonctions biologiques d'un gène particulier par des approches de génétique inverse.

A titre d'exemple, en se basant sur les liens phylogénétiques, la répartition chromosomique et l'homologie de séquences des GSTUs du peuplier du cluster V, un scénario hypothétique évolutif a pu être retracé (figure 18).

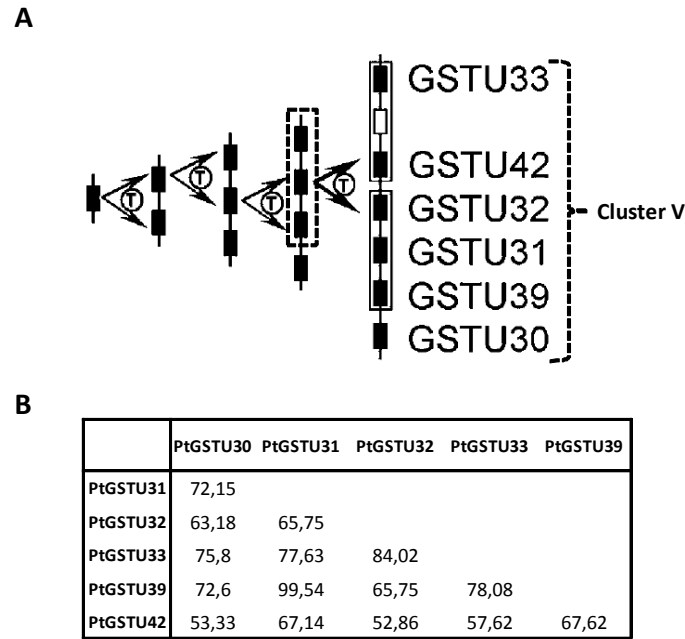


Figure 18 : Scénario évolutif hypothétique du cluster V comprenant des GSTs Tau du peuplier (Adapté de (Lan *et al.*, 2009)). (A) Diagramme schématisant de l'expansion du cluster V des gènes de GSTUs du peuplier. Les rectangles noirs ou blancs représentent un gène ou un pseudogène respectivement. Le T représente un événement hypothétique de duplication en tandem. Un groupe de trois gènes dupliqués est encadré. (B) Matrice d'homologie de séquence protéique des GSTUs du cluster V.

L'histoire de l'expansion de ce cluster est relativement simple et typique des GSTs de cette classe. Elle comporte quatre événements de duplication en tandem. Le dernier événement implique la duplication d'un groupe de trois gènes qui correspond probablement à l'événement de duplication intégrale du génome qui s'est produit il y a environ 60 millions d'années chez les salicacées (Lan *et al.*, 2009). Les identités de séquence entre ces protéines (Figure 18B) montrent que les séquences ont divergé depuis les événements de duplication à l'exception de PtGST31 et 39. Le degré de divergence au sein d'un cluster peut être bien moindre comme c'est le cas pour les onze GSTUs du cluster I qui partagent plus de 90% d'homologie de séquence.

En comparant des séquences de GSTs d'eucaryotes et de procaryotes, un modèle évolutif a été proposé au début des années 1990. Ce modèle stipule que les GSTs canoniques de plantes, d'animaux et de champignon dériveraient de la classe bactérienne ancestrale Thêta (Pemble *et al.*, 1992). Le caractère ubiquitaire de cette classe suggère que son apparition est antérieure à l'émergence des différents règnes du vivant. Les classes de GSTs solubles chez les eucaryotes et les procaryotes seraient la résultante de duplications d'un gène ancestral Thêta suivi d'évolution divergente. L'accroissement du nombre de structures

tridimensionnelles de protéines a montré que les GSTs solubles partageaient entre elles et avec d'autres familles de protéines un motif structural particulier, le repliement thiorédoxine. L'histoire évolutive des GSTs solubles est donc incluse dans celle de la superfamille de protéines à repliement thiorédoxine. En se basant non seulement sur la présence de certains domaines protéiques, l'état oligomérique, les activités biochimiques et la nature du résidu catalytique mais aussi sur la présence ou l'absence de certaines classes dans les règnes, un scénario évolutif a été proposé (Frova 2006). Ce modèle spécifie que l'ancêtre commun aux GSTs solubles et Kappa est une TRX / GRX à cystéine catalytique. Au cours de l'évolution, cet ancêtre a subi différentes modifications qui peuvent être intégrées dans un modèle évolutif comportant quatre étapes (figure 19) : 1) l'addition d'un domaine C-terminal hélicoïdal ; 2) la dimérisation ; 3) la substitution de la cystéine catalytique ancestrale par une sérine ; 4) la substitution de cette sérine par une tyrosine.

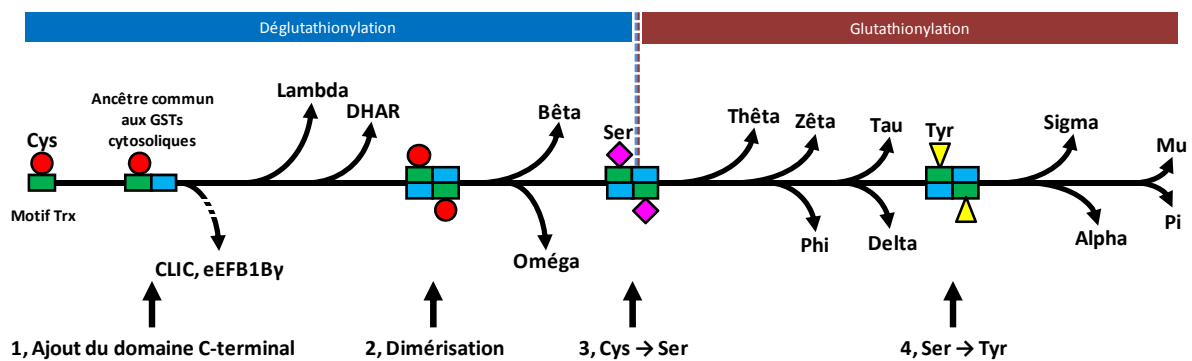


Figure 19 : Modèle évolutif des GSTs canoniques à partir d'un ancêtre commun de type thiorédoxine (adapté de (Frova 2006)). Les domaines thiorédoxine et hélicoïdal sont respectivement représentés en vert et en bleu. Les quatre étapes majeures de cette évolution sont représentées par des flèches verticales noires. Le résidu catalytique du motif thiorédoxine est schématisé par un rond rouge, un losange rose et un triangle jaune correspondant respectivement à une cystéine (Cys), une sérine (Ser) et une tyrosine (Tyr). Les flèches courbées noires correspondent à la divergence d'une classe particulière. Les GSTs catalysant des réactions de glutathionylation et de déglutathionylation sont indiquées.

La première étape d'addition est commune aux GSTs, aux CLICs et aux EF1Bys (classes apparentées aux GSTs canoniques). Les GSTs Lambda et DHAR ont divergé avant l'étape de dimérisation et ont conservé une structure monomérique tandis que les classes Bêta et Oméga qui ont divergé après cet événement sont dimériques. La troisième étape correspond à une substitution de la cystéine catalytique par une sérine. Soit dit en passant, les classes Bêta et Oméga sont propres aux bactéries et aux mammifères respectivement et présentent une organisation dimérique avec une cystéine catalytique. La troisième étape, qui correspond à une substitution de la cystéine catalytique par une sérine, constitue une frontière hypothétique

qui permet de séparer sommairement les GSTs en deux grands groupes aux propriétés catalytiques clairement différentes. En effet, la nature du résidu catalytique est déterminante car les GSTs à sérine catalysent la réaction de conjugaison du glutathion appelée glutathionylation tandis que les GSTs à cystéine catalysent la réaction inverse baptisée déglutathionylation. La quatrième étape quant à elle consiste en la substitution de la sérine catalytique en tyrosine et a donné naissance aux classes Sigma, Alpha, Mu et Pi chez les mammifères. A l'instar de la sérine, la tyrosine est un acide aminé hydroxylé et permet aux GSTs de catalyser le même type de réaction. Il n'existe pas de GSTs à tyrosine catalytique chez les plantes. Concernant les GSTs kappa, celles-ci présentent une sérine comme résidu catalytique ce qui semble en faveur de l'hypothèse du repositionnement du domaine hélicoïdal au cours de l'évolution.

Les classes mPGES2, GHR, métaxine, présentent un domaine supplémentaire et ne sont pas représentées sur ce schéma évolutif. Les classes hémérythrines, iota et Ure2p sont *a priori* restreintes aux lycophytes et aux bryophytes et ne sont pas non plus intégrées ce modèle.

4.5. Caractéristiques structurales des GSTs solubles de plantes

4.5.1. Le monomère

La première GST animale a été cristallisée en 1991 (Fu *et al.*, 1991) et la première de plante en 1996 (Reinemer *et al.*, 1996). A ce jour, tous règnes confondus plus de 200 structures de GSTs solubles sont disponibles dans la base de données PDB « Protein Data Bank ». Les GSTs de plantes, malgré des séquences primaires très divergentes, partagent un fort degré d'homologie structurale avec les GSTs de mammifères, d'insectes, de champignons et de bactéries (figure 20).

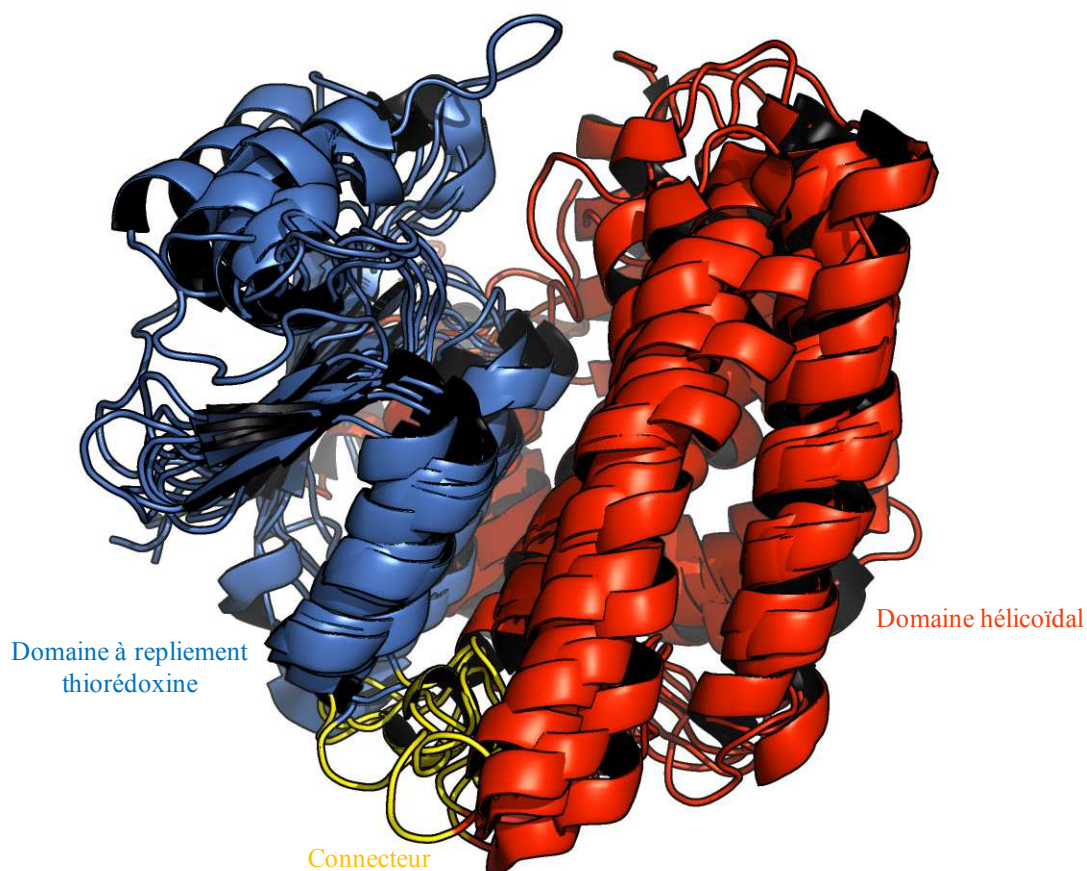


Figure 20 : Superposition des structures de monomère de GSTs spécifiques des plantes, des mammifères, des insectes, des champignons et des bactéries. Pour les plantes la classe Phi (GSTF1, *P. trichocarpa*, code PDB : 4RI6) et Lambda (GSTL1, *P. trichocarpa*, code PDB : 4PQH) sont montrées ; pour les mammifères, les classes Alpha (GSTA1, *Homo sapiens*, code PDB : 3Q74) et Mu (GSTM2, *Homo sapiens*, code PDB : 2C4J) sont représentées ; pour les insectes, les classes Delta (GSTD1, *Drosophila melanogaster*, code PDB : 3EIN) et Epsilon (GSTE2, code PDB : 2IMI) sont montrées ; pour les champignons la classe Ure2p (URE2P1, *Phanerochaete chrysosporium* code PDB : 4FOB) est représentée ; pour les bactéries la classe Bêta (OaGST, *Ochrobactrum anthropi*, code PDB : 2NTO) est montrée.

A l'exception de quelques classes, les GSTs solubles sont dimériques. Un monomère typique présente une masse moléculaire variant de 23 à 30 kDa pour une séquence de 200 à 250 acides aminés. Un monomère se compose d'un domaine N-terminal à repliement thiorédoxine relié par un connecteur à un domaine hélicoïdal en position C-terminale. La figure 20 représente la superposition structurale de monomères de GSTs spécifiques à certains *taxa*. Il apparaît qu'il existe une forte homologie structurale entre ces GSTs et que le domaine thiorédoxine est mieux conservé que le domaine C-terminal.

Comme il l'a été mentionné précédemment, le repliement thiorédoxine du domaine N-terminal est constitué d'un enchaînement de brin β et d'hélice α formant un motif $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$. Les brins parallèles β_1 , β_3 , β_4 et le brin antiparallèle β_2 forment le centre du repliement pris en sandwich d'un côté par l'hélice α_2 et de l'autre par les hélices α_1 et 3 (figure 21A). La boucle connectant l'hélice α_2 au brin β_3 contient une proline en configuration *cis* hautement conservée et nécessaire au repliement de la protéine. Le domaine C-terminal est quant à lui composé uniquement d'hélices α disposées autour d'un cœur hydrophobe (figure 21B). Il comporte au moins 4 hélices α mais ce nombre peut varier en fonction des classes. A titre d'exemple la protéine AtGSTF2, représentée sur la figure 21, compte 5 hélices α . Ce domaine C-terminal est moins conservé que le domaine N-terminal et sa topologie peut varier entre classes de GSTs.

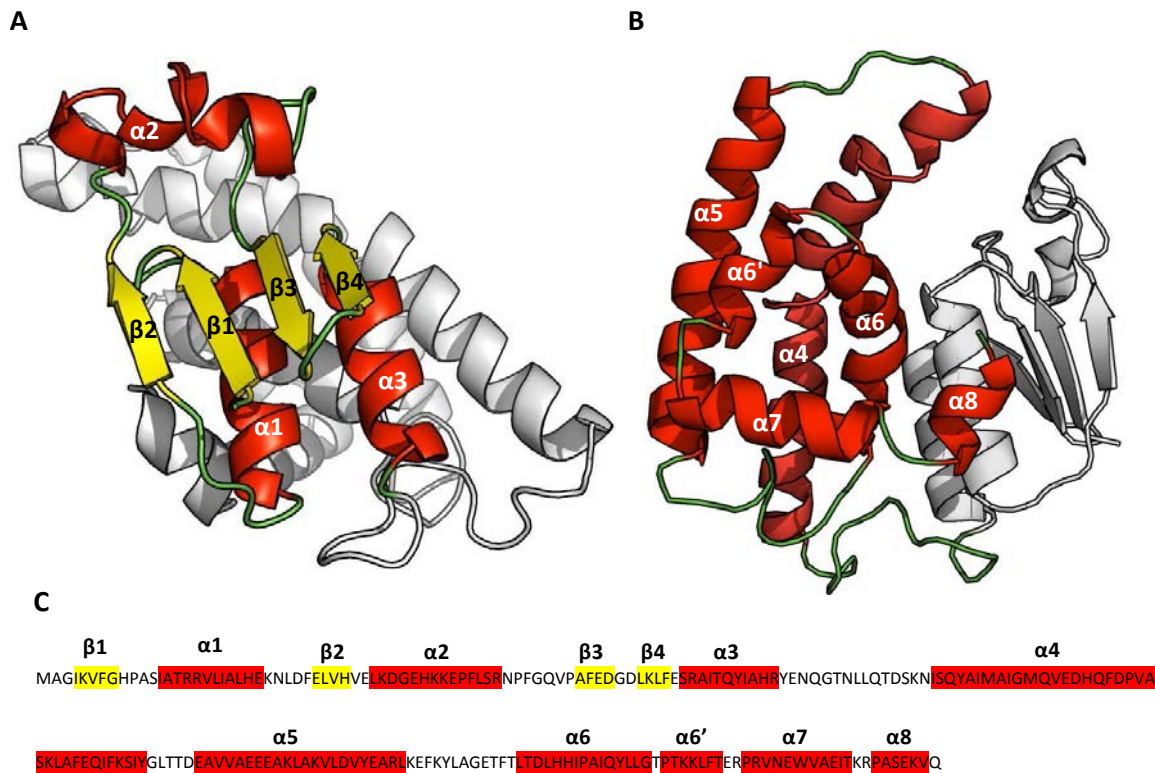


Figure 21 : Structure modulaire des GSTs (A) Représentation en mode flèche et ruban d'AtGSTF2 (code PDB : 1GNW (Reinemer *et al.*, 1996)). Le domaine thiorédoxine est présenté en (A) et le domaine hélicoïdal en (B). Les hélices α et les brins β sont colorés respectivement en rouge et jaune. La séquence en acides aminés d'AtGSTF2 est représentée en (C) où les éléments de la structure secondaire sont représentés selon le même code couleur qu'en (A) et (B).

1.1.1. Le site actif

Chaque monomère possède un site actif formé par deux sites adjacents impliqués dans la liaison de chaque substrat : le site de liaison du glutathion (site G) qui implique des résidus conservés provenant principalement du domaine N-terminal et le site de fixation des substrats hydrophobes (site H) qui est constitué par des résidus des deux domaines (figure 22).

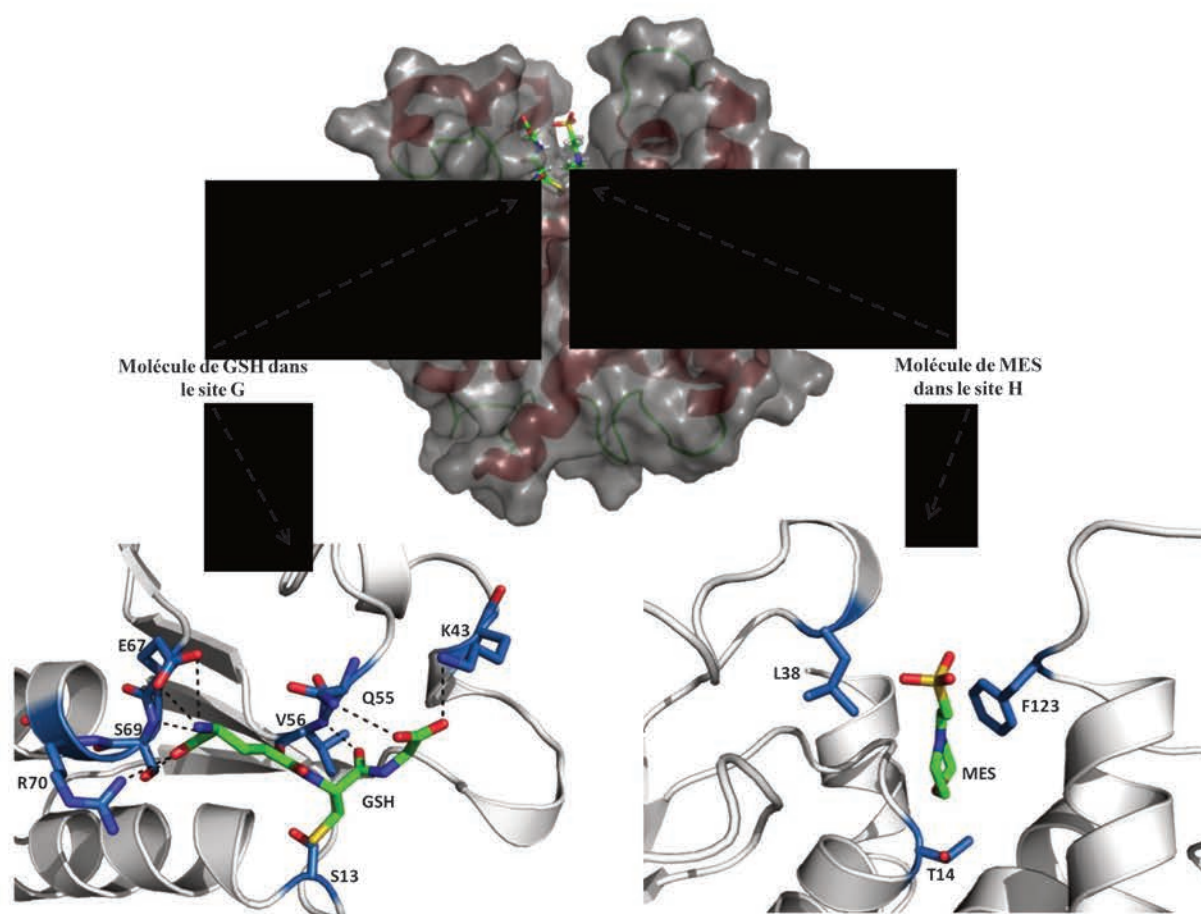


Figure 22 : Le site catalytique des GSTs. Représentation en mode cartoon et surface (délimitation des zones accessibles par le solvant) d'un monomère de la GSTF1 de *Populus trichocarpa* (code PDB : 4RI6) (Pegeot *et al.*, 2014). Les sites G et H, indiqués par une flèche, sont représentés de près avec une molécule de GSH dans le site G et une molécule de MES dans le site H représentées en mode fil de fer. Les liaisons entre deux atomes sont représentées par un fil dont la couleur indique l'élément atomique représenté : vert (carbone) ; rouge (hydrogène) ; bleu foncé (hydrogène) ; jaune (soufre). Les résidus interagissant avec ces molécules sont annotés et représentés en bleu clair et leur chaîne latérale en mode fil de fer.

Le site G permet la fixation du GSH dans une configuration étendue et d'orienter la fonction thiol de sa cystéine vers la poche hydrophobe du site H où est lié l'autre substrat. La fixation du GSH dans le site G entraîne son activation. Sur les huit groupements donneurs et accepteurs de liaison hydrogène du glutathion, au moins six interagissent systématiquement *via* ce type de liaison avec les résidus constituant le site G (figures 22 et 23). Parmi ces résidus, le résidu catalytique positionné en amont de l'hélice $\alpha 1$ est très conservé et joue un rôle primordial dans l'activation catalytique du GSH. Le mécanisme d'activation catalytique diffère entre les classes de GSTs à sérine catalytique qui interviennent dans les réactions de glutathionylation et les GSTs à cystéine catalytique qui ne possèdent pas cette activité mais sont plutôt impliquées dans des réactions de déglutathionylation. Pour les GST à sérine, une

liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle de l'acide aminé catalytique et le soufre de la cystéine du glutathion promeut la formation de l'anion thiolate (S⁻) qui est très réactif. Cette déprotonation a pour effet d'abaisser le pKa du groupement thiol de 8,7 (GSH libre) à des valeurs proches de 6 permettant à pH physiologique l'attaque nucléophile sur un substrat électrophile (Kolm *et al.*, 1992, Kong *et al.*, 1992, Dirr *et al.*, 1994). Au-delà de cette sérine catalytique, une étude poussée de l'interaction entre le GSH et une GST d'insecte suggère que le groupement carboxylate du résidu γ -glutamyl du glutathion, de par son interaction avec des résidus chargés environnants formant un réseau d'électrons partagé, était capable de déprotoner le groupement SH de la cystéine (Winayanuwattikun *et al.*, 2005). Pour les GSTs à cystéine catalytique, un pont disulfure doit se former avec la cystéine du glutathion lors d'une réaction de déglutathionylation. Cette cystéine catalytique possède un pKa abaissé par rapport à une cystéine non catalytique ce qui favorise la formation du thiolate à pH physiologique. Les autres résidus du site G sont conservés surtout au sein d'une même classe. Parmi eux, certains sont particulièrement importants et occupent les mêmes positions dans les structures de GSTs bien que leurs positions puissent varier dans la séquence primaire (Atkinson *et al.*, 2009). L'acide aminé positionné avant la *cis*-proline, généralement une thréonine, une leucine, une isoleucine ou une valine stabilise la cystéine du GSH via des liaisons hydrogène impliquant la chaîne principale. Pour les protéines de la superfamille des thiorédoxines, il a été aussi montré que cet acide aminé pouvait interagir avec la cystéine catalytique via des liaisons de type hydrogène ou hydrophobe et ainsi abaisser son pKa (Ren *et al.*, 2009). La courte boucle reliant le brin β 4 et l'hélice α 3 comporte un motif E/DS qui par des liaisons hydrogène stabilise les charges portées par les groupements NH₃⁺ et COO⁻ du γ -glutamyl du glutathion. La dernière position importante est occupée par un résidu basique (lysine ou arginine) situé dans la boucle β 2- α 2. Cet acide aminé stabilise le groupement carboxyle du résidu glycine du glutathion par un pont salin.

Le site responsable de la fixation des substrats hydrophobes ou site H est limitrophe au site G. Il se présente sous la forme d'une crevasse constituée principalement de résidus hydrophobes issus des domaines N et C-terminaux. De même les interactions avec le substrat sont établies par des interactions moléculaires hydrophobes. La position et la nature des acides aminés formant le site H sont bien plus variables que ceux constituant le site G pouvant considérablement différer au sein d'une classe et plus encore d'une classe à l'autre. Cela est en accord avec les fortes variations topologiques du domaine C-terminal hélicoïdal. Le nombre et la position des hélices α varient entre les classes de GST provoquant des

modulations structurales du site H. D'autre part, la polarité des résidus constituant le site H peut fortement varier. Dans l'ensemble, cette hyper-variabilité explique la large gamme de substrats reconnus par les GSTs (Armstrong 1997). Le site H est moins bien caractérisé que le site G car peu de GSTs ont pu être co-cristallisées en présence d'un ligand dans le site H alors que le glutathion, qui a un effet stabilisateur, est régulièrement co-cristallisé dans le site G. Cette absence de données structurales met en lumière certaines propriétés du site H. Celui-ci est plus ouvert que le site G et la molécule dans le site H n'interagit que par des interactions moléculaires hydrophobes qui par nature sont de faible énergie tandis que le GSH est lié par interactions moléculaires énergétiquement plus fortes.

Cette forte variabilité du site H ainsi que la nature variable des résidus catalytiques (sérine ou cystéine) est à la base de la diversité fonctionnelle des GSTs de plantes qui possèdent donc des fonctions catalytiques différentes et une grande diversité de substrats. Cela contribue à expliquer la multiplicité des GSTs dans les génomes de plantes. Paradoxalement, on peut voir sur la figure 22 que le site catalytique des GSTs est pour une enzyme relativement spacieux et ouvert ce qui peut expliquer le manque de spécificité d'une même GST qui peut accepter des substrats de structure et de nature chimique variés.

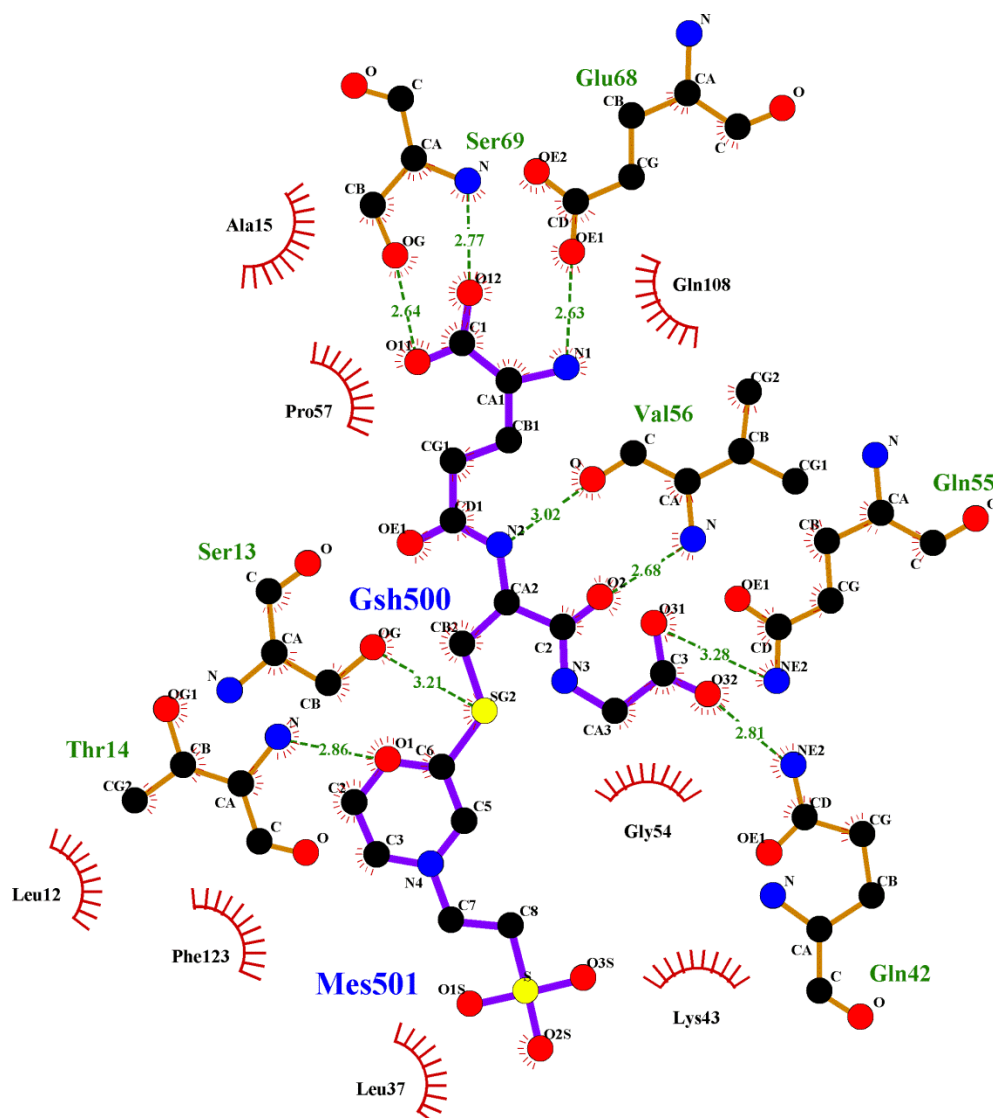


Figure 23 : Représentations en deux dimensions réalisées à l'aide du programme Ligplot + des interactions de type hydrophobe (rouge) et des liaisons hydrogènes (vert) entre les ligands co-cristallisés (GSH et Acide 2-morpholino éthanesulfonique (MES) et les résidus formant le site catalytique de la GSTF1 de *P. trichocarpa* (Pegeot *et al.*, 2014).

1.1.1. Le dimère

Dans les paragraphes précédents, la diversité structurale des GSTs a été discutée. De prime abord les enzymes de la famille des GSTs présentent une forte homologie au niveau structural mais elles peuvent être différenciées par des variations de la structure primaire, secondaire et tertiaire. C'est également le cas au niveau de la structure quaternaire puisque l'état et le mode d'oligomérisation peuvent varier d'une classe à une autre. A l'exception des GSTs Lambda, CLIC et DHAR qui sont monomériques, la plupart des GSTs caractérisées forment des dimères globulaires d'environ 50 kDa et de 50 Å de diamètre. Deux monomères s'associent selon une symétrie axiale de type C2 formant des dimères tête-bêche, c'est-à-dire

que le domaine N-terminal d'un monomère fait face au domaine C-terminal d'un autre monomère. Selon les classes, plusieurs types d'interaction impliqués dans l'assemblage du dimère sont possibles. Par exemple, pour la classe tau, les interactions sont essentiellement hydrophiles alors qu'elles sont principalement hydrophobes pour la classe phi et d'autres classes et impliquent le motif structural particulier « clé/serrure ». Dans ce motif, la clé est constituée par la chaîne latérale d'un acide aminé aromatique d'un monomère qui s'insère dans une serrure formée par les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ du domaine C-terminal de l'autre monomère (figure 24) (Armstrong 1997). Cela est important puisque même si chaque monomère possède des sites G et H et théoriquement devrait être actif de façon indépendante, l'état dimérique des GSTs semble essentiel à leur activité catalytique. En effet, lorsque des monomères solubles d'une GST ont été générés par mutagenèse dirigée (mutation du résidu clé), l'activité de ces protéines était fortement affectée bien que l'interface de dimérisation mutée soit éloignée du site actif (Hegazy *et al.*, 2004). Cela suggère que la dimérisation permet à l'enzyme d'adopter une conformation optimale nécessaire à la catalyse, en particulier au niveau de la structure tertiaire du site actif. Cela est clairement visible sur la figure 24 où les deux motifs clé/serrure encadrent le site actif de chaque monomère d'AtGSTF2, contribuant très probablement à une configuration fonctionnelle du site actif.

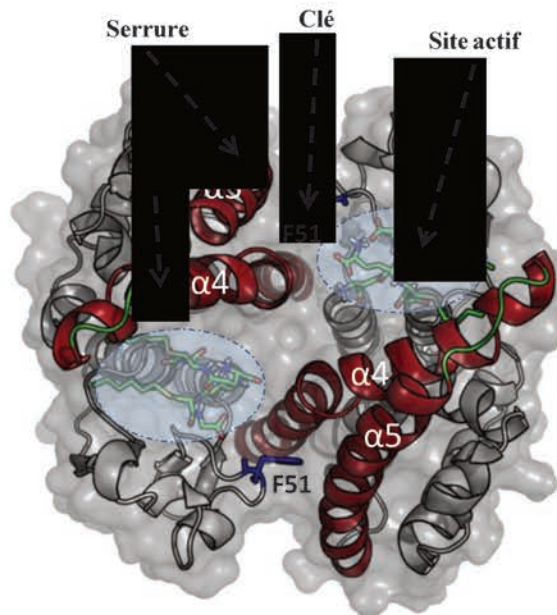


Figure 24 : Motif clé/serrure des GSTs. Le dimère d'AtGSTF2 (code PDB : 1GNW) est représenté en cartoon et surface. Le site actif de chaque monomère, matérialisé par les molécules co-cristallisées avec AtGSTF2 et représentées en mode fil de fer, est stabilisé de part et d'autre par un motif clé/serrure. Les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ de chaque monomère constituent la serrure et sont représentées en rouge. La phénylalanine en position 51 de chaque monomère est représentée en bleu en mode fil de fer et constitue la serrure.

L'interface de dimérisation forme une gorge dont la forme et la profondeur sont modulées par le nombre d'hélices α du domaine C-terminal, et plus particulièrement par la taille et l'orientation des hélices α_4 et α_5 du domaine C-terminal. Son accessibilité est également gouvernée par le degré d'hydrophobicité des résidus composant ces hélices (figure 25). Ces variations d'environnement moléculaire liées à la dimérisation influencent fortement la reconnaissance des substrats par les GSTs. A titre d'exemple, la figure 25A et B montre que cette gorge est très ouverte dans le cas de la GSTU alors que celle-ci est complètement fermée pour la GSTZ. Un exemple particulier concernant le mode de dimérisation est celui des GHRs qui ont une structure quaternaire atypique pour des GSTs solubles. Bien que la symétrie soit de type C2, seuls les domaines C-terminaux sont impliqués dans la dimérisation positionnant les domaines N-terminaux aux deux extrémités du dimère (figure 25C).

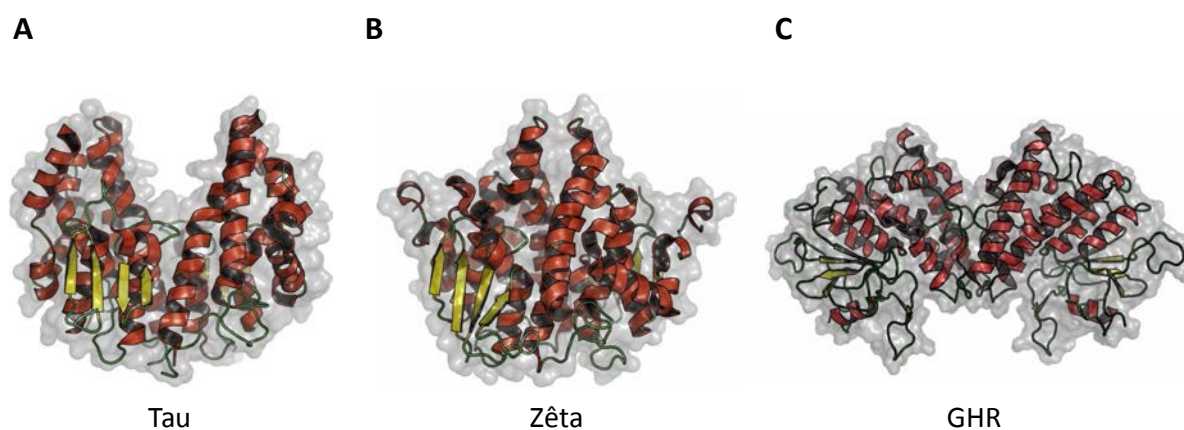


Figure 25 : Variation des structures quaternaires des GSTs. Représentation en mode ruban et flèche des dimères de la GSTU1 d'*Oryza sativa* (a) (code PDB = 1OYJ (Dixon *et al.*, 2003)), d'une GSTZ de *Coccidioides immitis* (b) (code PDB = 3N5O (Edwards *et al.*, 2011)) et de la GHR1 de *P. trichocarpa* (c) (code PDB = 4USS (Lallement *et al.*, 2015)).

4.5.4. Le site ligandine (site L)

Les premières GSTs découvertes ont été nommées ligandine en vertu de leur capacité à lier de nombreuses molécules organiques sans pour autant réaliser un acte catalytique (Litwack *et al.*, 1971, Habig *et al.*, 1974). Ultérieurement, des études structurales et biochimiques ont permis d'identifier des sites de fixation de ligands, appelés site ligandine ou site L. La GSTF2 d'*A. thaliana* a par exemple été co-cristallisée avec une molécule de S-hexylglutathion situé à proximité du site actif (figure 26A) (Reinemer *et al.*, 1996). Ce site de liaison additionnel est potentiellement très important puisqu'il permettrait de réguler l'activité des GSTs. En effet, cette même protéine peut lier différents hétérocycles (camaléxine,

flavonols, quercétine-3-O-rhamnoside) avec une forte affinité entraînant une augmentation de l'activité de conjugaison du GSH (Dixon *et al.*, 2011). Des analyses biochimiques sur la même enzyme ont mis en évidence deux sites de liaison différents pour l'acide indole 3-acétique et l'acide naphthalique, bien que l'affinité entre la protéine et ces molécules soit faible (Smith *et al.*, 2003). Différents sites L ont pu être identifiés pour des GSTs d'autres classes. Leurs localisations ne sont pas conservées entre classes. En effet, pour les GSTUs, un site L a été localisé dans une poche hydrophobe sur la surface externe du dimère, formée par des résidus généralement conservés au sein de cette classe (figure 26B) (Axarli *et al.*, 2009) alors que ce site a été identifié à l'interface de dimérisation pour la GST Mu de *Schistosoma japonicum* (figure 26C) (McTigue *et al.*, 1995) ou comme recouvrant une partie du site H pour une GST Pi humaine (figure 26D) (Oakley *et al.*, 1999).

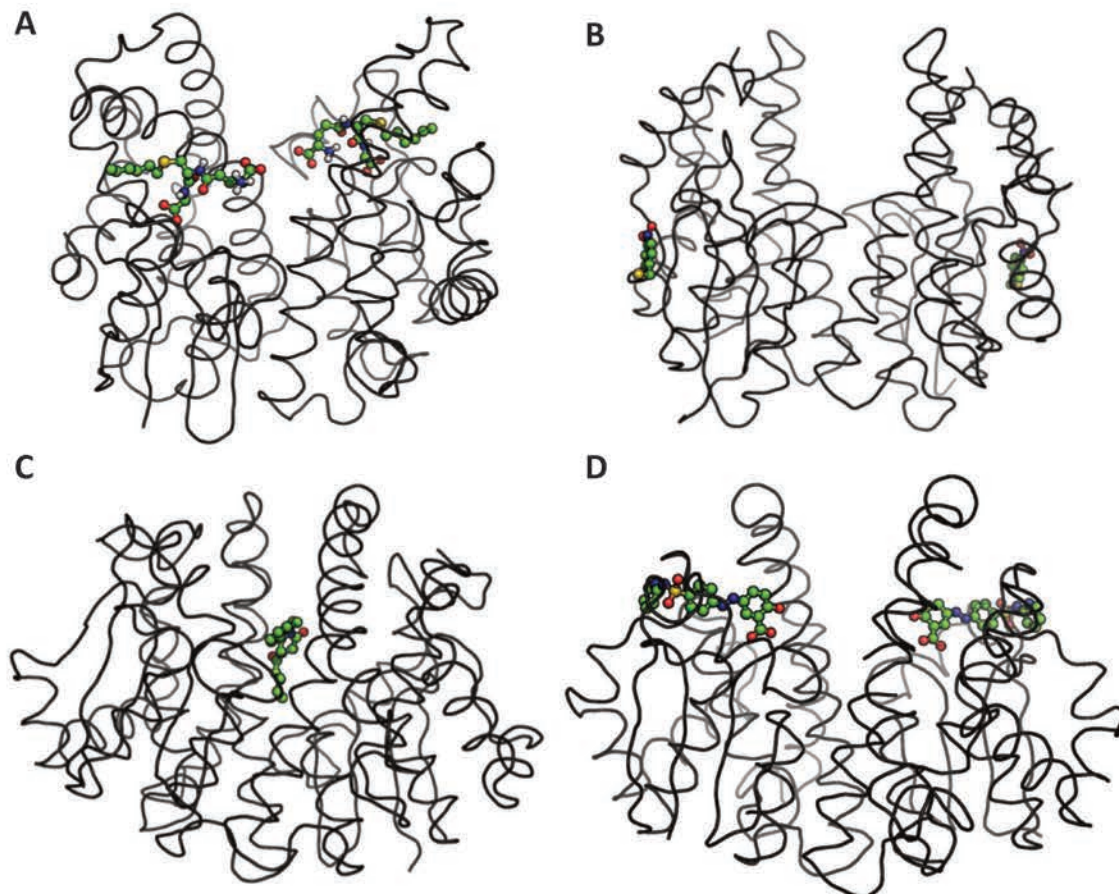


Figure 26 : Diversité des sites ligandines dans les GSTs. Représentation en ruban gris de GSTs co-cristallisées en complexe avec des molécules ligands représentées en sphère. (A) Dimère de la GSTF2 d'*A. thaliana* en complexe avec le S-hexylglutathion (Code PDB : 1GNW). (B) Dimère de GSTU4 de *Glycine max* en complexe avec le 4-nitrophénol-méthanethiol (code PDB : 2VO4) (C) Dimère de la GST Mu de *S. japonicum* en complexe avec le praziquantel (code PDB : 1GTB) (D) Dimère de la GSTP1-1 humaine en complexe avec la sulfasalazine (code pdb : 13GS).

4.6. Mécanismes enzymatiques employés par les glutathion transférases

Les fonctions de ces enzymes s'articulent principalement autour de l'interaction de la cystéine du glutathion avec le résidu catalytique des GSTs qui est soit une cystéine soit une sérine pour la plupart des GSTs de plantes. Dans les deux cas, la forte réactivité des cystéines joue un rôle central. Je m'attacherai donc dans ce chapitre à détailler dans un premier temps certaines propriétés des cystéines dans les systèmes biologiques. Ensuite, les aspects mécanistiques relatifs aux réactions catalysées par les GSTs seront décrits.

4.6.1. Les cystéines réactives

Le résidu cystéine comporte un groupement thiol (-SH) dont l'atome de soufre peut se trouver sous de nombreux états d'oxydation allant de +6 à -2. Il est donc sujet à de nombreuses modifications redox post-traductionnelles (Giles *et al.*, 2003). Cette propension à être réduit et oxydé, à l'instar de l'oxygène et du sélénium, place le soufre au cœur des réactions biologiques d'oxydoréduction. Les cystéines sont impliquées dans des réactions caractérisées par un échange d'électrons. Le plus souvent, l'activité d'oxydoréduction des protéines dépend de cofacteurs organiques tels que le NADH ou le NADPH ou comprenant un métal, du fer et du cuivre notamment. Cependant, les cystéines peuvent conférer directement aux protéines une activité de transfert d'électrons. La réactivité des cystéines dépend de plusieurs paramètres liés à leur environnement moléculaire. Seules les cystéines accessibles au solvant et dont le groupement thiol est déprotoné en thiolate sont actives. En effet, la forme thiolate est un puissant nucléophile alors que le thiol est relativement inerte. La capacité du thiol de la cystéine à s'ioniser est exprimée par son pKa, valeur indiquant le pH auquel un équilibre a lieu entre les formes protonées et déprotonées (Poole *et al.*, 2004, Mamathambika *et al.*, 2008). Les cystéines libres ont un pKa de 8,3 et ne sont donc que peu actives à des pH physiologiques compris entre 6,5 et 8. Les cystéines réactives présentent quant à elles une valeur de pKa abaissée en raison principalement de leur environnement moléculaire. A titre d'exemple, la forme thiolate peut être favorisée par l'interaction avec des acides aminés chargés positivement. Les GSTs ont su mettre à profit les propriétés biochimiques de la cystéine du glutathion pour catalyser des réactions très variées.

Les GSTs sont très versatiles d'un point de vue catalytique et les types de réactions catalysées par ces enzymes dépendent du type de substrat et surtout de la nature du résidu catalytique. Les classes de GSTs à sérine catalytique tels que les Phi, les Tau ou les Zêta assurent des réactions de conjugaison du glutathion sur un second substrat, la réduction

d'hydroperoxydes organiques ou l'isomérisation de molécules tandis que les classes de GSTs à cystéine catalytique assurent la réduction de ponts disulfure impliquant le glutathion ou le clivage de liaisons C-S (carbone-soufre). Les paragraphes suivants passeront en revue les détails mécanistiques de ces réactions enzymatiques.

4.6.2. *Activité de conjugaison du glutathion*

La réaction prédominante et historique des GSTs canoniques à sérine catalytique mais aussi des GSTs kappa et MAPEG est la conjugaison du glutathion sur tout un éventail de molécules électrophiles selon la réaction :



Dans cette réaction, RX représente une molécule susceptible d'accepter un électron et ne contenant pas nécessairement un pont disulfure ou une liaison peroxyde. En général, la réaction de conjugaison entraîne une augmentation de la solubilité de la molécule et une diminution de sa toxicité. La plupart des réactions catalysées par ces protéines sont des additions ou des substitutions nucléophiles davantage que des transferts. De ce fait l'appellation précise devrait être glutathion lyase mais la dénomination glutathion transférase est unanimement employée à ce jour. La conjugaison du GSH peut avoir lieu par substitution nucléophile aromatique ($\text{S}_{\text{N}}2_{\text{R}}$) ou linéaire ($\text{S}_{\text{N}}2$) ainsi que par une addition nucléophile. Dans tous les cas, le groupe nucléophile constitué par le groupement activé sous la forme thiolate de la cystéine du glutathion va attaquer un site pauvre en électrons.

Il semble que ce soit essentiellement la sérine catalytique qui conduit à abaisser le pKa du thiol de la cystéine du glutathion et donc à permettre sa déprotonation. Cette forme du glutathion est particulièrement nucléophile (excédentaire en électrons, attirée par les charges positives) et donc apte à réaliser des réactions d'addition ou de substitution nucléophile. En effet le doublet d'électrons libres du thiolate cherche à engager une liaison covalente avec des molécules présentant un centre électrophile (déficient en électrons, attirées par les charges négatives). Selon la nature du substrat, deux cas de figures sont ensuite possibles : (i) la substitution nucléophile où le GS^- va établir une liaison covalente avec le substrat au détriment d'un groupe nucléofuge partant (groupe avec une forte capacité à se détacher d'une molécule) ; (ii) l'addition nucléophile conjuguée ou de Michael où le GS^- établit une liaison covalente avec une molécule présentant classiquement une liaison carbonyle α,β -insaturée. A noter que la substitution nucléophile présente un caractère irréversible alors que l'addition nucléophile est réversible.

Le substrat modèle traditionnel pour l'analyse de l'activité de conjugaison du glutathion des GSTs est le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) en raison de sa forte réactivité et de son coefficient d'extinction molaire élevé (Habig *et al.*, 1974). La réactivité du CDBN est due au fait que le chlore, comme souvent pour les éléments chimiques de la colonne des halogènes, est un excellent groupe partant (très nucléofuge car électronégatif et polarisable). A ce propos, beaucoup de substrats synthétiques/modèles de GSTs, notamment des herbicides, présentent un groupement halogène. Le CDBN qui comprend un cycle benzénique aromatique est conjugué par le glutathion lors d'une réaction de substitution nucléophile aromatique (S_N2_{AR}) (figure 27). Cette réaction se déroule en plusieurs étapes. Initialement le glutathion et le CDBN se lient respectivement aux sites G et H constituant le site actif. L'ordre de liaison du substrat peut varier puisqu'il a été montré par exemple qu'une GSTF du maïs présente un mécanisme bi-bi aléatoire séquentiel (Labrou *et al.*, 2001). Les deux substrats se lient alors à l'enzyme l'un après l'autre mais sans ordre précis, l'affinité protéine-substrat régissant la probabilité de débiter le mécanisme réactionnel par un substrat ou l'autre. D'autre part, la comparaison des structures de GSTs sous formes apo et holo suggère que la liaison d'un substrat entraîne un ajustement allostérique du sillon catalytique (Labrou *et al.*, 2015). La liaison d'un premier substrat entraînerait donc une modification de l'affinité pour le second substrat. Dans tous les cas, une fois les deux substrats présents dans la poche catalytique, le glutathion sous forme thiolate attaque l'atome de carbone liant le chlore (figure 27). L'atome de carbone du CDBN où est lié le chlore forme alors un complexe de Meisenheimer (σ -complexe), état intermédiaire dans lequel il est lié au glutathion ainsi qu'à l'atome de chlore. Ensuite le chlore est éliminé sous forme de chlorure d'hydrogène puis le CDBN glutathionylé (GS-DNB) quitte le site actif de l'enzyme (Deponte 2013). Dans le cas d'une substitution nucléophile sur une molécule non aromatique (S_N2), le mécanisme est similaire à la différence que cette réaction a lieu en une seule étape, c'est-à-dire sans formation d'intermédiaire réactionnel.

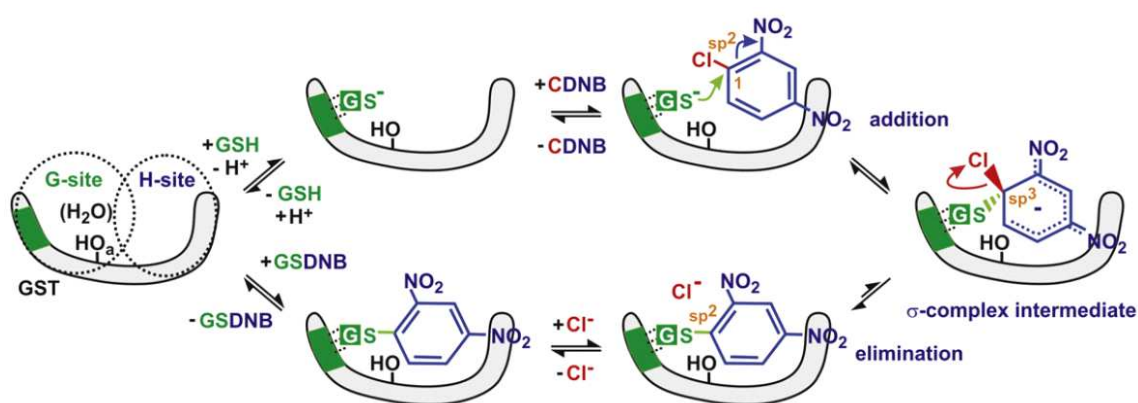


Figure 27 : Réaction de glutathionylation du CDNB par les GSTs (Deponte 2013). Modèle de la réaction de substitution aromatique (S_N2_{AR}) catalysée par les GSTs (voir détails dans la section «activité de conjugaison du glutathion »).

Dans le cas de l'addition nucléophile conjuguée ou de Michael, le GSH établit une liaison covalente avec le carbone β d'une liaison carbonyle α,β -insaturée et entraîne la rupture de la liaison π de la double liaison tandis que le carbone α est protoné afin de respecter sa valence (figure 28 A). Le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE), un produit dérivé de la peroxydation des lipides en chaîne non contrôlée constitue un accepteur de Michael de choix en raison de sa double liaison carbonylée insaturée entre le carbone 2 et 3 (Bruns *et al.*, 1999). Les GSTs sont capables de le glutathionyler pour qu'il soit dégradé hors de la cellule en acide mercapturique.

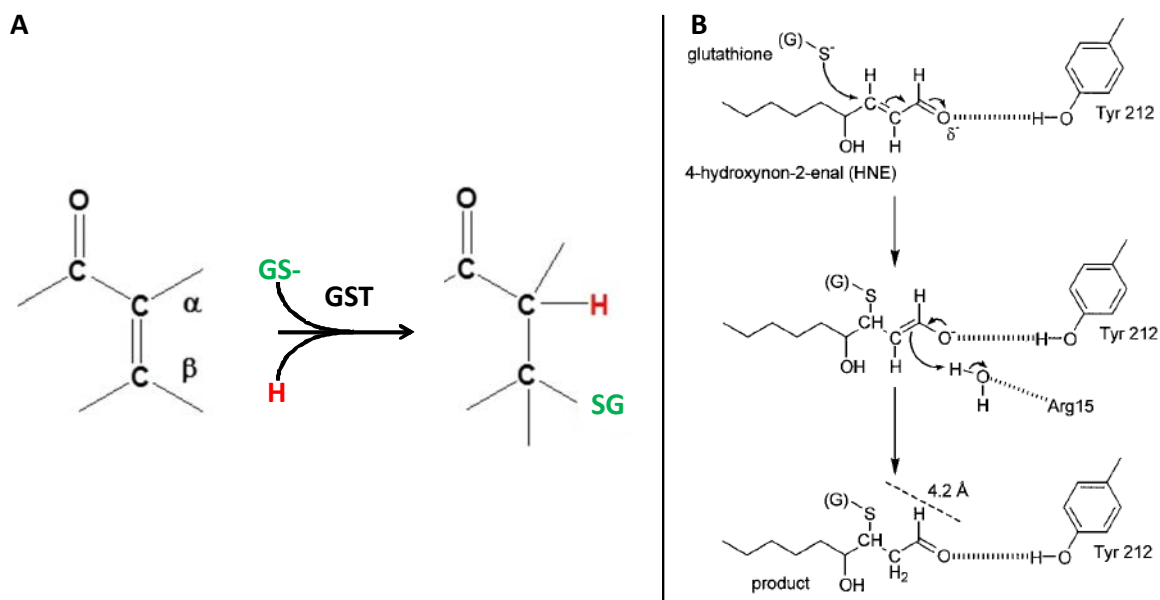


Figure 28 : L'addition nucléophile. (A) Modèle de la réaction d'addition nucléophile sur des liaisons carbonyles insaturées catalysée par les GSTs. (B) Mécanisme de détoxification du 4-hydroxy-2-nonéanal par glutathionylation (Bruns *et al.*, 1999). La stabilisation du HNE dans le site actif permet son attaque par l'anion thiolate du glutathion. L'adduit glutathionylé sera relargué du site actif puis exporté hors de la cellule où il sera dégradé en acide mercapturique.

4.6.3. Activité glutathion peroxydase

Le pouvoir réducteur du glutathion peut être également mis à profit pour réduire différents hydroperoxydes par plusieurs familles d'enzymes telles que les PRXs (Dietz 2011), les GPXs à sélénocystéines (Toppo *et al.*, 2009), certaines GRXs (Collinson *et al.*, 2002) ainsi que de nombreuses GSTs (Dixon *et al.*, 2009). Lors de cette réaction, le glutathion est utilisé comme donneur d'électron et la réduction de l'hydroperoxyde entraîne la production de GSSG concomitante à la production d'eau ou d'alcool (figure 29 A). Dans le cas des GSTs, le GS⁻ induit une substitution nucléophile de la liaison entre les deux atomes d'oxygène du groupement hydroperoxyde (ROOH) (figure 29 B). Il en résulte un groupement GSOR ainsi qu'un OH qui est protoné en H₂O par un donneur de proton inconnu. Le GSOR est ensuite clivé en GSSG et ROH par une seconde substitution nucléophile du GSH. Le mécanisme catalytique concernant cette deuxième réaction n'est pas complètement élucidé puisque plusieurs scénarii sont envisagés. Le GSOR pourrait : a) réagir avec du GSH alors qu'il est encore lié à l'enzyme ; b) réagir après avoir quitté l'enzyme ; c) être remplacé dans le site G par une molécule de glutathion qui serait déprotonée et plus apte à réaliser la substitution nucléophile (figure 29 B) (Deponte 2013).

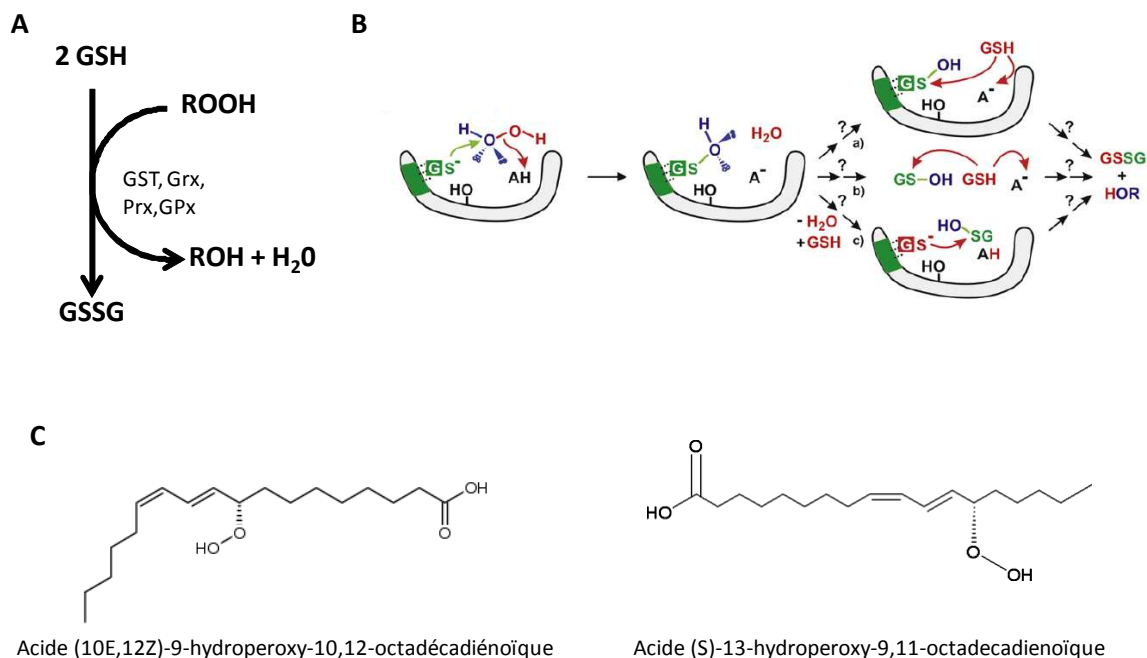


Figure 29 : Réduction des hydroperoxydes. (A) Aperçu général de la réaction de réduction d'hydroperoxydes qui est catalysée par diverses enzymes dont les GSTs, PRXs, GPXs et quelques GRXs. (B) Mécanisme enzymatique de réduction du peroxyde d'hydrogène par les GSTs (voir détails dans la section « Activité glutathion peroxydase des GST ») (Deponte 2013). (C) Exemple d'acides gras peroxydés réduits par les GSTs.

En général, l'efficacité catalytique des GSTs assurant cette réaction est inférieure à celle mesurée pour les peroxydases plus classiques. Les contributions relatives de ces différentes familles à la réduction des hydroperoxydes cellulaires restent mal connues et semblent varier selon le type d'organisme et le compartiment subcellulaire. Parmi les GSTs, seules celles appartenant aux classes Phi, Tau et Thêta sont capables de catalyser ces réactions. Plusieurs exemples indiquent notamment que les GSTs sont spécialisées dans la réduction des acides gras peroxydés. A titre d'exemple, elles sont capables de réduire l'acide (10E,12Z)-9-hydroperoxy-10,12-octadécadiénoïque et l'acide (S)-13-hydroperoxy-9,11-octadécadiénoïque (figure 29, C) (Prabhu *et al.*, 2004), deux acides gras peroxydés en conditions de stress oxydant cellulaire. Les GSTs pourraient donc se distinguer des autres peroxydases par la nature des substrats, ceux-ci pouvant être particulièrement volumineux, en accord avec le large sillon catalytique de ces enzymes.

4.6.4. *Activité isomérase*

Certaines GSTs sont capables de catalyser des réactions d'isomérisation de métabolites spécifiques comme c'est le cas des GSTs Zêta. Lors de cette réaction, le glutathion est considéré comme un cofacteur car il n'est pas consommé. La molécule à isomériser est néanmoins glutathionylée transitoirement ce qui permet un déplacement d'électrons permettant la transformation de la molécule. Une GST bactérienne appartenant probablement à la classe Zêta, bien que non décrite en tant que telle, catalyse une isomérisation *cis-trans* du maléylpyruvate en présence de glutathion (Marsh *et al.*, 2008). Bien que le mécanisme précis d'isomérisation reste incertain, un modèle réactionnel a été déduit à partir des données structurales disponibles (figure 30).

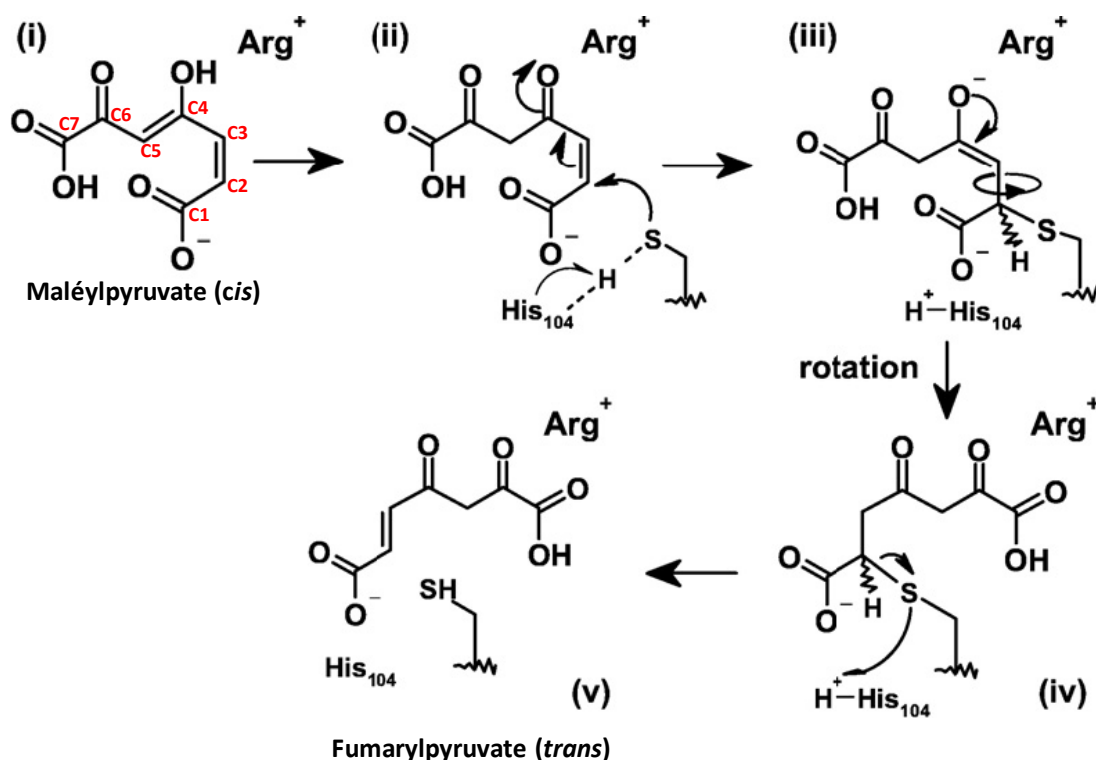


Figure 30 : Réaction de cis-trans isomérisation du maléylpyruvate (Marsh *et al.*, 2008). Mécanisme enzymatique hypothétique de l'isomérisation du maléylpyruvate en fumarylpyruvate. Les différentes étapes de la réaction sont détaillées dans le paragraphe associé.

L'entrée du *cis*-maléylpyruvate (i) dans le site actif est suivie d'un déplacement de la double liaison entre les carbones C4-C5 vers une liaison entre le carbone C4 et l'oxygène attaché (ii). Il s'ensuit une addition nucléophile de l'ion thiolate du glutathion (déprotoné par l'His₁₀₄) sur le carbone C2 qui transforme la double liaison C2-C3 en simple liaison (ii) ce qui permet la rotation de 180° du groupement pyruvique sur cet axe générant ainsi l'isomère *trans* (iii). La molécule est ensuite déglutathionylée (iv) pour générer finalement le fumarylpyruvate (v) qui cédera sa place dans le site actif à une molécule de maléylpyruvate en raison de son affinité moindre pour l'enzyme.

4.6.5. Activité de déglutathionylation

La présence d'une cystéine à la place d'une sérine comme résidu catalytique modifie radicalement les propriétés biochimiques des GSTs puisque ce résidu contribue plutôt à catalyser des réactions de déglutathionylation. Ce type d'activité est classiquement évalué *in vitro* contre l'hydroxyéthyl-disulfide (HED) et le DHA (figure 31). Lors de ces tests enzymatiques, on présume que ces molécules sont spontanément glutathionylées par une incubation préalable avec du GSH comme il l'est représenté sur la figure 31 (réaction 1).

Ensuite, ces molécules conjuguées sont déglutathionylées par l'enzyme grâce à l'attaque nucléophile du thiolate de la cystéine catalytique qui provoque la rupture de la liaison covalente liant le glutathion au substrat (réaction 2). La cystéine est ensuite régénérée par une seconde attaque nucléophile, cette fois-ci du GSH, pour former du GSSG (réaction 3) (Gravina *et al.*, 1993). Dans le cas du HED il s'agit de la réduction d'un pont disulfure tandis que dans le cas du DHA une liaison carbone-soufre serait clivée. Ce mécanisme est comparable au mécanisme monothiol utilisé par les GRXs pour la déglutathionylation de protéines (Rouhier *et al.*, 2008).

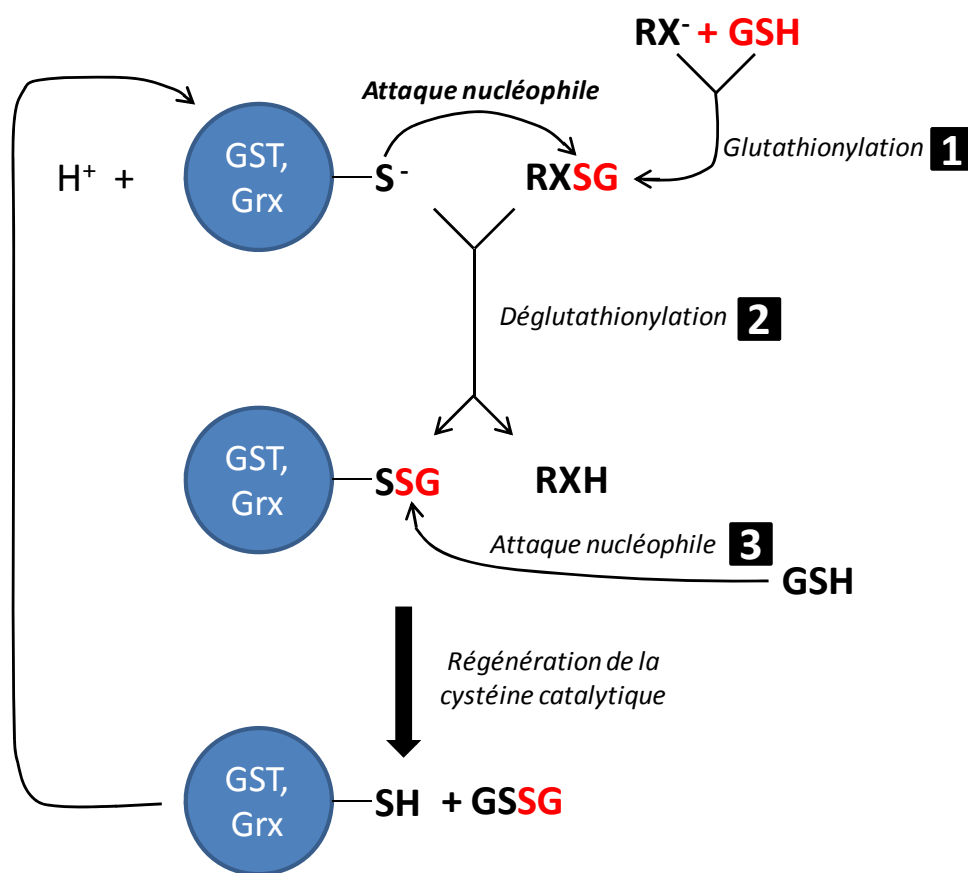


Figure 31 : La déglutathionylation : Différentes étapes de la réaction enzymatique de déglutathionylation catalysée par les GSTs à cystéine catalytique (voir paragraphe « Activité de déglutathionylation »). X représente un atome de carbone ou de soufre.

En général, les substrats glutathionylés sont déglutathionylés selon un mécanisme ping-pong (un produit est relargué entre les additions successives des substrats), à l'instar de la figure 31. Le HED est le substrat canonique pour déterminer la présence, l'activité et les paramètres cinétiques des Grxs et des GSTs à cystéine. Or, l'analyse des paramètres cinétiques pour plusieurs enzymes actives contre le HED montre que la réaction avec ce

substrat a lieu selon un mécanisme séquentiel (la réaction enzymatique n'intervient qu'après formation d'un complexe entre l'enzyme et les deux substrats) (Mieyal *et al.*, 1991, Mesecke *et al.*, 2008). Cette contradiction a toujours été déroutante pour les utilisateurs de ce test. Dans le test réalisé avec le HED, il est considéré que le GSSEtOH résultant de la formation d'un pont disulfure le GSH et le HED de façon non enzymatique est le substrat pris en charge par les GRXs (Gravina & Mieyal, 1993). Une étude récente a montré que la vitesse de formation spontanée du GSSEtOH est trop lente pour expliquer les vitesses de catalyse mesurées pour les Grxs (Begas *et al.*, 2015). De plus, l'analyse fine des différents paramètres et des conditions réactionnelles de ce test avec la Grx7 de *Saccharomyces cerevisiae* ou la Grx de *Plasmodium falciparum* ont poussé les auteurs de cette étude à conclure qu'au moins certaines GRXs peuvent directement catalyser la réduction du pont disulfure du HED (Begas *et al.*, 2015). En revanche, un mécanisme ping-pong a été décrit pour ce test pour la GSTB-B1 de *Proteus mirabilis*, en accord avec le modèle initial. Il est donc possible que les deux modèles de mécanismes réactionnels soient valables (Caccuri *et al.*, 2002).

Devant cette problématique, il est intéressant de noter que d'autres molécules pouvant être glutathionylées *in vitro* sont utilisées pour la caractérisation enzymatique de différentes classes de GSTs à cystéine catalytique. Par exemple le S-glutathionyl-phénylacétophénone et la S-glutathionyl-tétralone sont des cétones généralement prises en charge par les GSTs de la classe Lambda et les GSTs fongiques de la classe Oméga (Meux *et al.*, 2013, Lallement *et al.*, 2014), la S-glutathionyl-quercétine est un flavonol déglutathionylé par les GSTs de la classe Lambda (Lallement *et al.*, 2014) alors que la S-glutathionyl-ménadione est une quinone déglutathionylée par les GHRs (Lallement *et al.*, 2015). Ces molécules, ou des molécules fortement apparentées, sont retrouvées dans la cellule et peuvent constituer des substrats physiologiques.

A l'instar des autres oxydoréductases à thiol, pour être sous forme thiolate à pH physiologique la cystéine catalytique présente au niveau des GSTs doit présenter une valeur de pKa abaissée comparé à celle d'une cystéine libre au pKa de 8,3 (Mamathambika *et al.*, 2008). Il a été montré pour les GRXs que la cystéine équivalente à celle présente dans les GSTs à cystéine possède une valeur de pKa de 4,6 pour GrxC3/C4, de 5 pour GrxC1/C2 (Couturier *et al.*, 2013) et de 3,9 pour GrxS12 (Zaffagnini *et al.*, 2008). Parmi les facteurs contribuant à ioniser la cystéine, il a été mis en évidence que la valine, isoleucine ou thréonine trouvée en position -1 de la *cis*-proline diminue le pKa de la cystéine catalytique par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes et de liaisons hydrogène (Mössner *et al.*, 1998, Ren *et al.*, 2009). D'autre part, la cystéine catalytique des protéines de la famille des

thiorédoxines est localisée à l'extrémité N-terminale de l'hélice $\alpha 1$, élément structural qui se comporte comme un dipôle et donc contribue à l'ionisation de la cystéine (Kortemme *et al.*, 1995).

4.7. Fonctions associées aux GSTs canoniques de plantes

4.7.1. Les classes de GSTs à cystéine

Les GSTs contenant une cystéine sont capables de catalyser des réactions de déglutathionylation de façon similaire aux GRXs bien que les cibles soient différentes puisque les substrats des GRXs sont des protéines oxydées tandis que les substrats des GSTs à cystéine sont généralement constitués par différents métabolites. Les classes de GSTs à cystéine se retrouvent dans la plupart des organismes et sont représentées chez les plantes par les DHARs, les GSTLs, les GHRs, les GSTHs et les GSTIs. Les fonctions des DHARs dans la régénération de l'ascorbate sont clairement caractérisées et les GSTs de la classe Lambda semblent impliquées dans le recyclage de métabolites oxydés. Les GHRs quant à elles apparaissent comme spécialisées dans la réduction de quinones. Les GSTs Iota, Hémérythrine et Ure2p sont limitées aux plantes non-vasculaires. Ces dernières semblent avoir été perdues lors de la divergence des spermaphytes et leurs fonctions restent mystérieuses.

4.7.1.1. Déshydroascorbate réductase (DHAR)

Les DHARs sont spécifiques aux plantes et ce sont sûrement les GSTs pour lesquelles la fonction endogène est la mieux connue. Ces enzymes font partie du cycle ascorbate-glutathion qui joue un rôle central dans la détoxification cellulaire du peroxyde d'hydrogène et implique notamment l'ascorbate, le glutathion, le NADPH ainsi que les réductases reliant ces métabolites (Foyer *et al.*, 2011). Elles ne présentent ni activité transférase, peroxydase ou isomérase mais sont spécialisées dans le recyclage de l'ascorbate, *i.e.* la réduction du DHA en ascorbate (Figure 32). Elles présentent une cystéine catalytique au sein d'un motif de type CPFC/S capable de former un pont disulfure avec du GSH et éventuellement un pont intramoléculaire lorsque 2 cystéines sont présentes. Des GSTs d'autres classes avec une cystéine catalytique tels que les GSTs lambda présentent également des activités de réduction du déshydroascorbate *in vitro*, cependant leur efficacité catalytique est inférieure de plusieurs ordres de grandeur par rapport aux DHARs (Lallement *et al.*, 2014).



Figure 32 : Réduction de l'acide déshydroascorbique en acide ascorbique.

Il a été déterminé par chromatographie d'exclusion de taille que les DHARs sont monomériques. En général, trois à quatre gènes codant les DHARs sont présents dans les génomes de plantes terrestres et un seul gène assez divergent est retrouvé chez certaines algues (Lallement *et al.*, 2014). Les études transcriptionnelles concernant les DHARs ont montré que des transcrits sont retrouvés dans la plupart des organes des plantes analysées (communication personnelle, Pierre-Alexandre Lallement). Il semble que toutes les plantes comportent au moins une isoforme cytoplasmique et une isoforme chloroplastique. De plus, des données de protéomique et l'utilisation de fusions traductionnelles avec la GFP ont également permis d'identifier une DHAR d'*A. thaliana* dans les peroxysomes et les mitochondries (Chew *et al.*, 2003, Reumann *et al.*, 2009). Les données sur les territoires d'expression et la localisation subcellulaire des DHARs semblent en accord avec la fonction essentielle de ces enzymes dans le cycle ascorbate-glutathion.

4.7.1.2. Lambda (GSTL)

Les GSTs de la classe lambda, spécifiques aux plantes, sont comme les DHARs des GSTs monomériques, à cystéine catalytique retrouvées au sein d'un motif CPxA capable de former un pont disulfure avec du GSH (Lallement *et al.*, 2014). Comme les autres GSTs à cystéine catalytique, elles ne présentent pas les activités peroxydase, transférase ou isomérase typiques des GSTs à sérine. Les fonctions endogènes de ces enzymes restent inconnues, bien que leur capacité à déglutathionyler la quercétine glutathionylée (figure 33), un flavonoïde antioxydant, suggère un rôle dans le recyclage de flavonoïdes oxydés (Dixon *et al.*, 2010, Lallement *et al.*, 2014). La capacité des GSTLs à lier parfois avec une haute affinité et de façon non catalytique d'autres molécules de la même famille ainsi que des porphyrines et des tocophérols (figure 33) indique une potentielle implication dans le métabolisme et/ou le transport de ces métabolites secondaires. De façon intéressante, l'affinité pour ces molécules est faible en absence de GSH dans le site actif alors qu'elle est forte si une molécule de GSH

est liée covalamment à la cystéine catalytique (Dixon *et al.*, 2010, Dixon *et al.*, 2011). Le mécanisme de liaison de ces métabolites pourrait donc être régulé par le glutathion. On pourrait par exemple faire l'hypothèse que la présence d'un glutathion lié covalamment permettrait de favoriser une activité ligandine. Généralement trois à quatre gènes codant des GSTLs sont dénombrés chez les organismes photosynthétiques. Chez *A. thaliana*, *P. trichocarpa* ou encore *P. patens*, des isoformes cytoplasmiques et une isoforme systématiquement chloroplastique ont été identifiées (Dixon *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2013, Lallement *et al.*, 2014). Leur présence récurrente dans ces compartiments subcellulaires suggère une fonction importante et conservée.

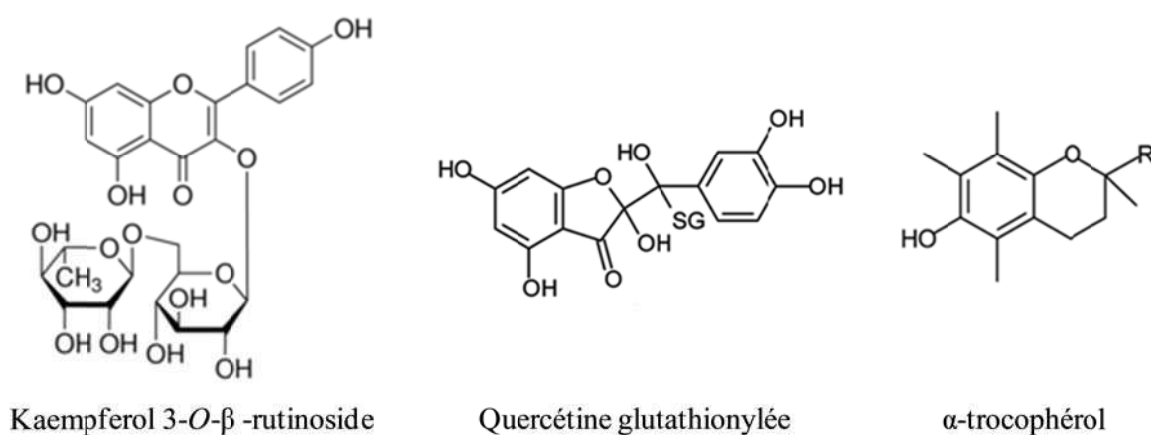


Figure 33 : Représentation semi-développée de certains ligands ou substrats identifiés des GSTLs.

4.7.1.3. Glutathionyl-hydroquinone réductases (GHRs)

A l'instar de la protéine PcpC appartenant à la classe TCHQD, les GHRs ont été initialement découvertes chez la bactérie du sol *S. chlorophenolicum* comme appartenant à la voie catabolique du pentachlorophénol qui est assurée essentiellement par quatre gènes : pcpA, pcpB, pcpC et pcpE (Cai *et al.*, 2002). PcpF a été ensuite identifié en raison de sa position chromosomique proche de PcpC (Cai *et al.*, 2002). PcpF présente la même activité de déhalogénéation des chloroquinones que PcpC, mais ces deux enzymes partagent en réalité très peu d'homologie. Leurs motifs catalytiques diffèrent et les analyses phylogénétiques les placent dans deux classes bien distinctes, les TCHQDs et les GHRs.

Les GHR sont présentes chez les bactéries, les halobactéries, les champignons et les plantes. Cette localisation ubiquitaire dans le vivant suggère des fonctions endogènes importantes, mais celles-ci sont méconnues à ce jour. On compte quatre gènes codant pour

des GHRs chez *A. thaliana*, deux chez le maïs et le peuplier et un chez le riz. Il est intéressant de noter qu'il existe systématiquement au moins une isoforme chloroplastique chez ces organismes, et dans le cas du peuplier ou du maïs, toutes sont adressées à ce compartiment (Belchik *et al.*, 2011, Lallement *et al.*, 2015). D'un point de vue structural, deux monomères s'associent selon un axe de symétrie C2, à l'instar des autres GSTs. Le mode de dimérisation des GHRs est néanmoins singulier au sein de la famille des GSTs puisque les monomères s'associent uniquement par le domaine C-terminal, en particulier par l'intermédiaire d'une boucle de vingt résidus en aval de l'hélice $\alpha 9$ que l'on ne retrouve pas dans les autres classes de GSTs (Lallement *et al.*, 2015). Elles présentent également une insertion d'une trentaine d'acides aminés dans le domaine TRX entre le brin $\beta 2$ et l'hélice $\alpha 2$. Ce mode de dimérisation particulier et cette insertion pourraient être à l'origine de propriétés biochimiques inédites ou pourraient permettre la reconnaissance de substrats particuliers. Les GHRs présentent une cystéine catalytique en position 50 dans un motif catalytique très conservé de type CPWA (Belchik *et al.*, 2011). Comme c'est le cas pour les GSTs à cystéine catalytique, les GHRs ne présentent pas d'activité transférase, peroxydase ou isomérase mais des activités de type thiol-transférase et DHAR. Les GHRs sont capables de déglutathionyler des quinones avec des bonnes efficacités catalytiques suggérant que cette classe de composés organiques pourrait constituer les substrats endogènes de ces enzymes. Elles présentent une plus forte affinité pour les formes réduites qu'oxydées, Cependant, les formes majeures de quinones dans les cellules sont l'ubiquinone et la plastoquinone qui sont localisées dans les membranes et ne présentent pas de carbones susceptibles d'être glutathionylés. En conséquence, la nature des substrats physiologiques des GHRs reste encore mystérieuse mais la localisation chloroplastique récurrente des GHRs chez les plantes indique que les substrats sont à rechercher dans ce compartiment.

4.7.1.4. Hémérythrine (H)

Ces GSTs atypiques ont été identifiées récemment chez la bryophyte *Physcomitrella patens* et contiennent un domaine GST auquel est fusionné un domaine hémérythrine du côté C-terminal (Liu *et al.*, 2013). Des protéines contenant un domaine hémérythrine sont retrouvées aussi bien chez les eucaryotes et les procaryotes (Bailly *et al.*, 2008), mais contrairement à leurs nom, celles-ci sont des protéines sans hème capables de lier des ions métalliques. Chez les algues vertes et les angiospermes, ces domaines hémérythrines ont été fusionnés à un domaine protéique à doigt de zinc. Ces GSTs à domaine hémérythrine ne se

retrouvent que dans les génomes des bryophytes et des lycophytes et leurs propriétés biochimiques, physiologiques et structurales n'ont pas encore été étudiées à ce jour. L'alignement du domaine thiorédoxine des GSTs à hémérythrine avec d'autres GSTs permet d'identifier une cystéine conservée à la position de l'acide aminé catalytique (Liu *et al.*, 2013). En se basant sur la capacité des GSTs à lier le glutathion et la capacité des hémérythrines à lier les ions métalliques, il peut être envisagé que leurs rôles pourraient être similaires aux phytochélatines, en lien avec la chélation de métaux. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'aucun gène codant pour une phytochélatine synthase n'a été identifié chez *P. patens*.

4.7.1.5. Iota (I)

Comme pour les GSTs à domaine hémérythrine, les GSTs de la classe iota ont été identifiées récemment lors d'une analyse phylogénétique exhaustive des GSTs de *P. patens* (Liu *et al.*, 2013). Au final, cette classe n'est représentée à ce jour que par une isoforme dans le génome de la bryophyte *P. patens* et de la lycophyte *Selaginella moellendorffii*. L'alignement de ces séquences avec d'autres GSTs indique qu'elles possèdent également une cystéine catalytique. Les propriétés biochimiques, structurales et les fonctions de ces protéines n'ont pas encore été étudiées à ce jour.

4.7.2. *Les classes de GSTs à sérine*

Parmi les quatorze classes de GSTs identifiées chez les plantes, les classes Tau, Phi, TCHQD, Zêta et Thêta présentent clairement une sérine catalytique conservée et toutes sont organisées en dimère. Alors que les GSTs Zêta ont une fonction clairement identifiée dans le catabolisme de la tyrosine et que les GSTs Thêta sont très certainement impliquées dans le métabolisme oxydatif, les fonctions des GSTs appartenant aux autres classes restent plus floues. La question des rôles associés aux GSTs des classes Phi et Tau est importante car ces deux classes représentent plus de 75 % des GSTs trouvées chez les plantes. Bien que ces GSTs possèdent des rôles déterminants du fait de leur activité de conjugaison dans la tolérance aux herbicides chez les plantes céréalières, cette activité ne représente clairement pas leur rôle ancestral. Les paragraphes suivants dressent l'état des connaissances sur les différentes classes de GSTs à sérine catalytique.

4.7.2.1. Thêta (T)

Les GSTTs sont conservées chez les animaux et les plantes et forment des classes restreintes avec par exemple deux et trois isoformes chez *P. trichocarpa* et *A. thaliana* respectivement. Ces enzymes possèdent une faible activité de conjugaison du glutathion contre les substrats modèles classiques mais elles présentent en revanche une forte activité peroxydase dépendante du glutathion contre le cumène hydroperoxyde, un substrat modèle ainsi que contre des peroxydes d'acide linoléique, un acide gras polyinsaturé essentiel présent dans la membrane cellulaire (figure 34) (Dixon *et al.*, 2009). Les GSTTs ont été caractérisées chez *A. thaliana* et ces enzymes présentent un pI basique autour de 9. Des études protéomiques ainsi que des fusions traductionnelles avec la GFP ont montré que ces protéines ont une localisation peroxysomale, ce qui est en accord avec la présence de motifs d'adressage C-terminaux de type SKI/M (Dixon *et al.*, 2009). Les peroxysomes sont le siège de la β -oxydation, voie catabolique principale des acides gras, qui contribue notamment à la production de l'acétyl-CoA, du NADH et du FADH₂. Ce processus génère donc de nombreux lipides peroxydés qui constituent probablement les substrats physiologiques des GST Thêtas. Par épissage alternatif, les *GSTT2* et *GSTT3* d'*A. thaliana* peuvent coder une GSTT présentant une extension C-terminale ressemblant au facteur de transcription myb qui masque le signal d'adressage au peroxysome. Dans le cas de cette version longue d'AtGSTT3, une fusion avec la GFP présente une localisation exclusivement nucléaire sous la forme de points (Dixon *et al.*, 2009). La raison de cette localisation nucléaire reste incertaine bien qu'il puisse être supposé que cette enzyme avoir un rôle dans la réparation de bases d'ADN ayant subi des dommages oxydatifs.

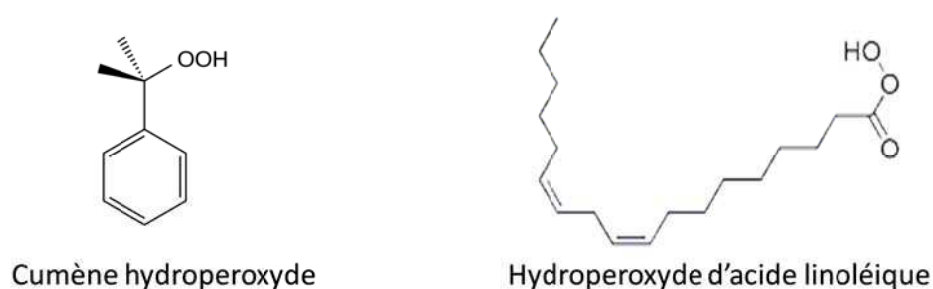


Figure 34 : Exemples d'hydroperoxydes réduits par les GSTs Thêta.

4.7.2.2. Zêta (Z)

Les GST zêta sont très conservées chez les eucaryotes, ce qui en général est indicateur d'une origine ancienne et de fonctions importantes. Par exemple la GSTZ1 du peuplier partage 40 % d'identité de séquence avec la GSTZ1 humaine. Cette classe comporte en général un nombre réduit d'isoformes avec par exemple, deux isoformes chez *P. trichocarpa*

et *A. thaliana* et trois isoformes chez *Oryza sativa*. Ces enzymes sont inactives ou faiblement actives en tant que GSH transférases et peroxydases. En revanche, ces enzymes sont impliquées dans l'avant-dernière étape de la voie du catabolisme de la tyrosine, étape conduisant à l'isomérisation du maleylacétoacétate en fumarylacétoacétate chez l'ensemble des eucaryotes (figure 35) (Fernández-Cañón *et al.*, 1998, Edwards *et al.*, 2011)

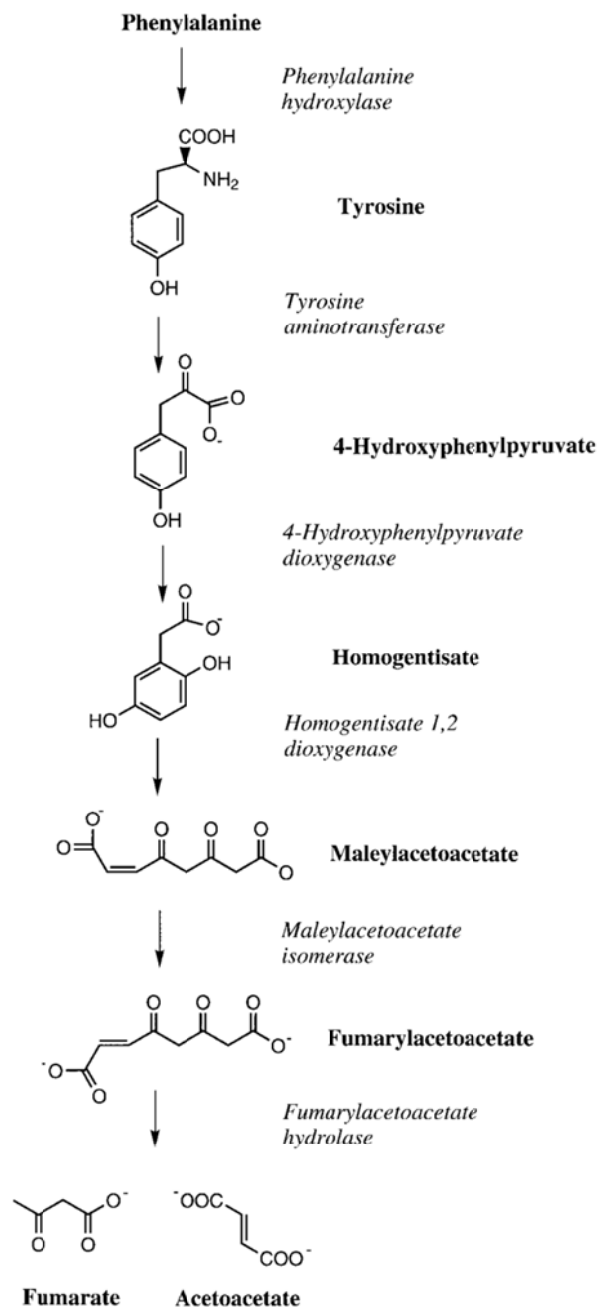


Figure 35 : Voie du catabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine (Thom *et al.*, 2001). Les GSTs Zêta assurent la réaction de l'isomérisation du maleylacétoacétate en fumarylacétoacétate (appelée maleylacetoacetate isomerase dans le schéma).

Le mécanisme catalytique des GST zêta diffère des autres GSTs puisque le glutathion est dans un premier temps conjugué de façon réversible sur la double liaison *cis* du maleylacétoacétate permettant la réaction d'isomérisation. Dans un deuxième temps, le GSH est éliminé permettant la formation de fumarylacétoacétate (Thom *et al.*, 2001). L'étude structure-fonction de la GSTZ1 d'*A. thaliana* a montré qu'un motif catalytique SSC très conservé chez les eucaryotes était impliqué dans la stabilisation du GSH. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que la première sérine du motif est catalytique. Il peut être supposé que cette sérine est nécessaire à la catalyse de la réaction de conjugaison du glutathion et que la cystéine, à l'instar des classes de GSTs à cystéine, permet de faciliter la déglutathionylation du produit intermédiaire. Cependant, le rôle de cette cystéine conservée reste mystérieux, puisque les GSTZs bactériennes qui ne présentent pas cette cystéine sont pourtant capables de catalyser la même réaction. Le site H des GSTs Zeta est constitué de résidus plus hydrophiles que les GSTs des autres classes afin de pouvoir lier les groupements acides du maleylacétoacétate (Thom *et al.*, 2001).

4.7.2.3. Tétra-chlorohydroquinone déhalogenase (TCHQD)

Les TCHQDs ont été découvertes chez la bactérie du sol *Sphingobium chlorophenolicum* qui est capable d'utiliser comme source de carbone le pentachlorophénol, un fongicide utilisé dans la préservation du bois. Lors du processus de dégradation du pentachlorophénol, cette enzyme catalyse la déshalogénation réductrice du tetrachlorohydroquinone en trichlorohydroquinone puis en dichlorohydroquinone (Xun *et al.*, 1992). Cette TCHQD bactérienne (PcpC) présente un motif actif de type SCIS et le mécanisme catalytique supposé pour réduire les chloroquinones est séparé en deux étapes (figure 36) (Willett *et al.*, 1996). Dans un premier temps la quinone est glutathionylée entraînant le départ d'un ion chlorure. Par analogie avec les autres GSTs à sérine, cette glutathionylation pourrait être imputée à l'action d'une sérine du site actif, bien que cela n'ait pas été démontré à ma connaissance. La conjugaison du glutathion pourrait également avoir lieu spontanément. Dans un deuxième temps, le glutathion est retiré de la quinone par une attaque nucléophile du thiol de la cystéine. En effet, si cette cystéine est substituée en sérine, cette dernière étape n'a pas lieu (Willett *et al.*, 1996, Kiefer *et al.*, 2002). Cette GST bactérienne présente donc potentiellement les propriétés de GSTs à sérine et à cystéine catalytiques.

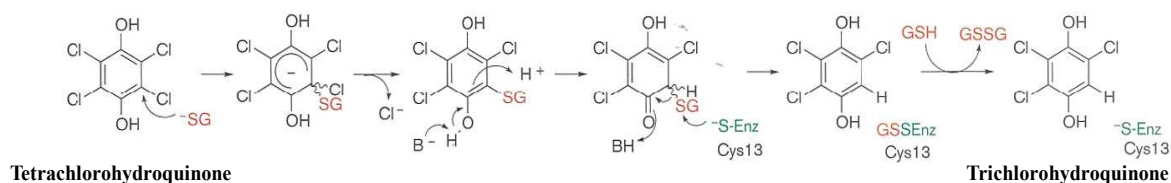


Figure 36: Mécanisme catalytique supposé de la TCHQD de *S. chlorophenolicum* (Willett *et al.*, 1996). L'atome de chlore en position 5 sur la quinone est déhalogéné par une étape de glutathionylation suivie d'une étape de déglutathionylation réalisée par une attaque nucléophile du groupement thiol de la cystéine 13.

L'étude des génomes montre que les TCHQD sont présentes chez les animaux, les champignons et les plantes. Les génomes de plantes comprennent généralement un seul gène codant pour une TCHQD. Une différence majeure est l'absence de cystéine dans le motif catalytique qui est de type SxDS où x constitue un acide aminé variable (Lallement *et al.*, 2014). Les isoformes de plantes ne devraient donc pas être capables de réaliser l'étape de déglutathionylation qui pourrait être réalisée par les GHRs. Hormis le fait qu'elles pourraient métaboliser des xénobiotiques chlorés, le rôle et la nature des substrats physiologiques de ces enzymes restent cependant méconnus chez les plantes. Elles sont proches en terme d'identité de séquence des GST Zêta et de ce fait elles peuvent également catalyser la réaction d'isomérisation du maleylacétoacétate (Anandarajah *et al.*, 2000). La TCHQD d'*A. thaliana* fusionnée à la GFP présente une localisation au niveau de la membrane plasmique (Dixon *et al.*, 2009). Au niveau de la structure primaire, ces protéines présentent une insertion de 25 acides aminés en milieu de séquence ainsi qu'une extension C-terminale par rapport à une GST classique.

4.7.2.4. Les GSTs Phi (F) et Tau(U)

Les fonctions et particularités des GSTs des classes Phi et Tau seront décrites dans la même partie. Cela permettra de présenter sans redondance les multiples caractéristiques qu'elles partagent et de mettre en exergue leurs différences. Dans la famille des GSTs, les classes phi et tau contrastent avec les autres classes de par le nombre imposant de gènes qui les composent. A titre d'exemple, il y a 55 gènes codant pour des GSTs identifiés dans le génome d'*A. thaliana* dont 28 GSTUs et 13 GSTFs (Wagner *et al.*, 2002). Le constat est similaire chez *P. trichocarpa* où ces deux classes représentent près de 75% des isoformes de cette famille avec un génome qui compte 81 gènes dont 53 GSTUs et 8 GSTFs (Lan *et al.*, 2009). La raison de cette abondance n'est pas bien comprise actuellement. Généralement les GSTUs sont plus nombreuses que les GSTFs mais le blé (*Triticum aestivum*) comprend par

exemple 38 GSTFs et 26 GSTUs (Galle *et al.*, 2009). La comparaison inter-espèce de ces classes montre qu'il est généralement difficile définir des orthologues stricts pour une isoforme donnée. Ces deux classes ont été découvertes très tôt et dans les premières classifications les GSTFs et les GSTUs étaient respectivement classées comme GSTs de type I et de type III respectivement (Droog *et al.*, 1995). Pour cette raison, elles ont été le sujet de nombreuses études qui portaient à l'époque exclusivement sur leurs capacités de détoxification des herbicides chez les plantes céréalières (Mozer *et al.*, 1983, Wiegand *et al.*, 1986). En effet, les GSTFs et les GSTUs sont des acteurs importants du système de détoxification des plantes. Ce processus est composé de trois phases et permet l'inactivation et/ou l'élimination de composés toxiques d'origine endogène ou exogène (figure 37) (Coleman *et al.*, 1997). Lors de la première phase, différentes oxydoréductases telles que les cytochrome P450 monooxygénases catalysent des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse ou d'hydroxylation afin d'introduire ou d'exposer un groupement fonctionnel électrophile à la surface du substrat. Au cours de la deuxième phase, la molécule modifiée est sujette, selon sa nature, à une réaction de conjugaison (glutathionylation ; acylation, acétylation ; méthylation ; hydratation ; glucurono-conjugaison ; sulfoconjugaison) assurée par différentes familles d'enzymes dont notamment les GSTs qui catalysent le transfert du glutathion. La glutathionylation permet notamment d'augmenter la solubilité de ces molécules et leur prise en charge lors de la troisième phase par des transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette) tels que les pompes à composés S-glutathionylés (GS-X pump) (Ishikawa *et al.*, 1997, Keppler 1999). Par l'intermédiaire de ces transporteurs, la molécule glutathionylée est excrétée dans le cas de modèles animaux et/ou séquestrée dans la vacuole et/ou la paroi cellulaire chez les champignons et les plantes. Ce système de détoxification fait partie du xénome. Le terme xénome englobe tous les biosystèmes assurant la détoxification, le transport et la biotransformation des composés toxiques.

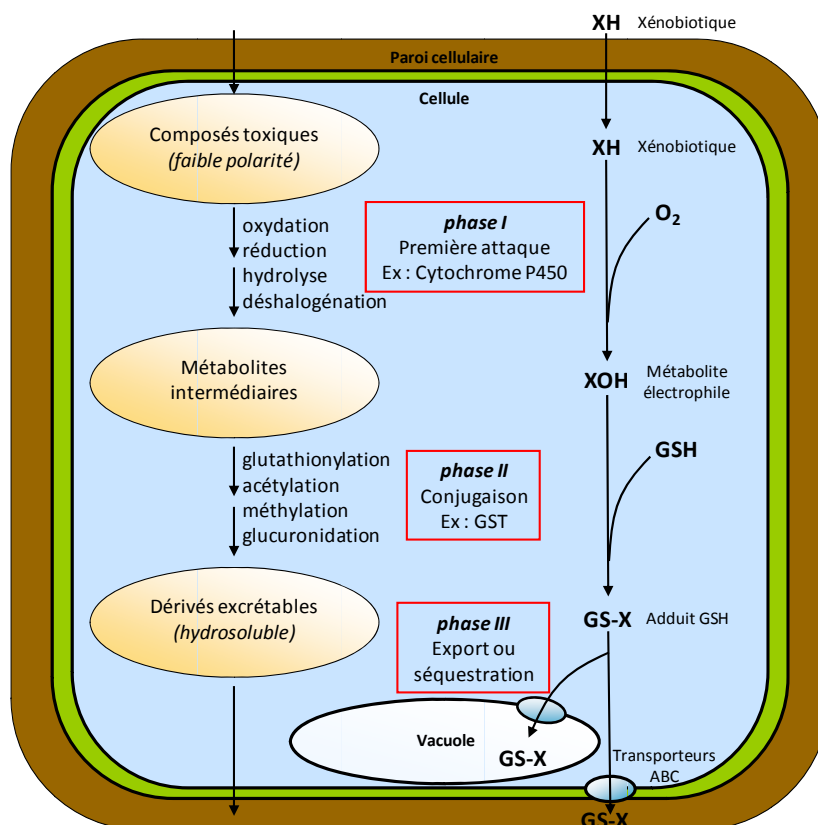


Figure 37 : Représentation du système de détoxification en trois phases chez les plantes et les champignons (Morel *et al.*, 2013). A gauche de la figure : le mécanisme général du système de détoxification en trois phases. A droite de la figure : exemple de la détoxification, par ce système, d'un xénobiotique chez les plantes ou les champignons. Lors de la première phase, le composé toxique est modifié par oxydation par les cytochrome P450 monooxygénases. La molécule, devenu électrophile, est reconnue par les GSTs qui conjuguent une molécule de glutathion sur ce substrat lors de la deuxième phase. Enfin, ce composé est séquestré dans la vacuole ou excrété dans la paroi cellulaire lors de la troisième phase.

Les GSTFs et les GSTUs participent ainsi à la détoxification des classes d'herbicides majeures utilisées en agriculture telles que les triazine-S-chlorées, les chloroacétanilides, les thiocarbamates et les diphenyl éthers (figure 38).



Figure 38 : Représentants de grandes classes d'herbicides métabolisés par les GSTFs et GSTUs. Les sites de glutathionylation sont indiqués par une flèche rouge. L'atrazine et le métalochlore sont glutathionylés par une substitution nucléophile et le fluorodifen par une addition nucléophile.

Les herbicides ci-dessus sont dit sélectifs c'est-à-dire qu'ils sont efficaces seulement contre les adventices des plantes céréalières sans nuire à ces dernières. Bien entendu, les adventices possèdent également des GSTFs et des GSTUs capables d'éliminer ces produits phytochimiques. Cependant, la sélectivité des herbicides semble due à des niveaux d'expression constitutifs des *GSTs* (ainsi que d'autres enzymes de détoxication) considérablement plus élevés chez les plantes cultivées que chez les mauvaises herbes (Cummins *et al.*, 2011). Une étude a par ailleurs montré que l'activité de conjugaison sur des herbicides à partir d'extraits bruts de protéines était jusqu'à 20 fois plus élevée chez le maïs que chez les adventices qui lui sont associées (Hatton *et al.*, 1996). Ces taux d'expression élevés de GSTs se retrouvent chez d'autres plantes cultivées comme le soja (Gronwald *et al.*, 1998), le blé (Cummins *et al.*, 1997) ou le riz (Deng *et al.*, 2002). Cela semble donc être chez ces espèces un trait biologique désirable sélectionné positivement durant leur domestication pour une raison qui reste néanmoins inconnue. D'ailleurs, les mauvaises herbes qui ont développé une résistance aux herbicides présentent entre autres des niveaux d'expressions élevés de GSTs. Un cas intéressant concerne le vulpin des champs (*Alopercurus myosuroides*), une mauvaise herbe des champs cultivés dont une population a développé une résistance à de multiples herbicides. Cette population résistante présente de très forts niveaux d'expression d'une GSTF. Cette enzyme est faiblement active comme transférase mais possède une forte activité glutathion peroxydase ce qui entraîne une diminution des niveaux d'hydroperoxydes dus à l'exposition aux herbicides (Cummins *et al.*, 1999, Cummins *et al.*, 2009). Des plants transgéniques d'*A. thaliana* exprimant cette même protéine acquièrent une résistance contre de multiples herbicides et de façon intéressante accumulent 2 à 3 fois plus des flavonoïdes protecteurs (flavonols et anthocyanines) que les plants non transformés, phénotype observé initialement chez *A. myosuroides* (Cummins *et al.*, 1999). Ces changements métaboliques suggèrent que cette GSTF1 exerce directement ou indirectement un effet régulateur positif sur le métabolisme de ces molécules antioxydantes. Etant donné que cette GSTF1 présente des propriétés ligandine envers des flavonoïdes d'extraits d'*A. thaliana* et de *A. myosuroides*, les auteurs de cette étude ont proposé que cette propriété permettrait de stabiliser des intermédiaires de la voie de synthèse de ces flavonoïdes facilitant ainsi leur synthèse et leurs accumulation dans les cellules. D'autres études relient ces GSTs au métabolisme secondaire et plus précisément au métabolisme des anthocyanines (métabolites de la classe des flavonoïdes), des pigments vacuolaires responsables de la coloration des pétales et des fruits. En effet, l'extinction des gènes *AN9* chez le pétunia (*Petunia hybrida*) (Alfenito *et al.*, 1998), *tt19* chez *A. thaliana* (Kitamura *et al.*, 2004), *GSTF2* chez l'œillet

(*Dianthus caryophyllus*) (Momose *et al.*, 2013) et *GST4* chez la vigne (*Vitis vinifera*) (Gomez *et al.*, 2011) conduit à des phénotypes «décolorés» (figure 39). Les vacuoles ne sont pas colorées en raison de taux d'anthocyanines extrêmement bas. Tous ces gènes codent des GSTs de la classe Phi qui, une fois n'est pas coutume, partagent une forte homologie.

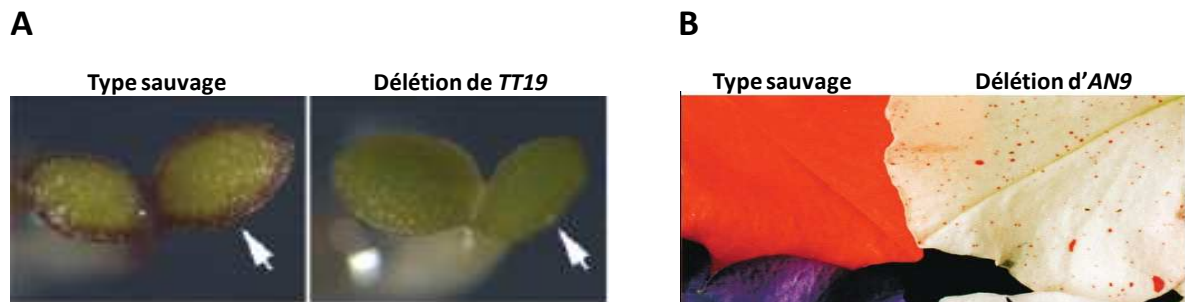


Figure 39 : Phénotypes sauvages et de mutants de *A. thaliana* *TT19* (A) (Kitamura *et al.*, 2004) et de *P. hybrida* *AN9* (B) (Alfenito *et al.*, 1998).

La voie de synthèse de ces pigments est relativement bien caractérisée et celle-ci se produit à la surface du réticulum endoplasmique, du côté cytoplasmique. En revanche le mécanisme de transport des anthocyanines du cytoplasme vers la vacuole reste incompris. Tirant partie de l'autofluorescence de ces pigments, le trafic cellulaire des anthocyanines a été étudié finement chez la vigne. Ces pigments sont présents au niveau du tonoplaste mais aussi à plus fortes concentrations dans de petites vésicules mobiles proches de la vacuole (Gomez *et al.*, 2011). Seule l'accumulation des anthocyanines dans les petites vésicules est toujours visible dans des mutants d'extinction du gène *GST4* suggérant que cette GST est nécessaire à leur séquestration dans la vacuole (Gomez *et al.*, 2011). Il a été suggéré que la vacuolisation des anthocyanines avait lieu selon un mécanisme similaire aux processus de détoxification, cependant aucune anthocyanine glutathionylée n'a jamais pu être produite *in vitro* ou observée lors d'extraction de métabolites de plantes. En accord avec ce constat, les GSTFs impliquées dans ce processus présentent un site actif dépourvu de sérine catalytique pourtant caractéristique de cette classe et nécessaire à l'activité de conjugaison. A l'inverse, le motif catalytique présente quasi systématiquement une cystéine. L'analyse des profils métaboliques chez le mutant *tt19* d'*A. thaliana* montre une accumulation anormalement forte de certaines procyanidines (métabolites proches des anthocyanines) dont le caractère insoluble suggère que ces dérivés sont aberrants (Kitamura *et al.*, 2010). C'est pourquoi les auteurs proposent que la protéine *TT19* lie et stabilise les précurseurs de synthèse, sensibles à l'oxydation, de ces procyanidines, permettant ainsi une accumulation normale de procyanidines. Il a été

ultérieurement montré que la protéine recombinante TT19 présentait une propriété ligandine envers des anthocyanines (Sun *et al.*, 2012). En considérant ces différents éléments et la localisation cytoplasmique de ces protéines (TT19, GST4), il peut être postulé que TT19 est une protéine de transport soit de précurseurs d'anthocyanine et/ou d'anthocyanines matures du cytosol vers le tonoplaste.

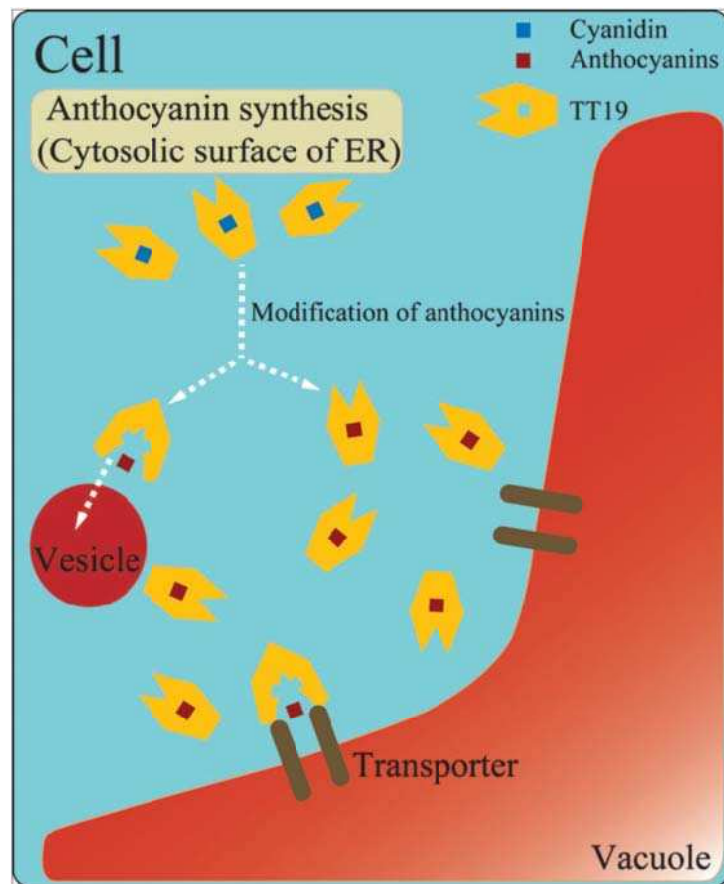


Figure 40 : Modèle du rôle de TT19 dans le transport des anthocyanines (Sun *et al.*, 2012). TT19 lie les dérivés d'anthocyanines synthétisés à la surface du réticulum endoplasmique. Le complexe pigment-TT19 est ensuite acheminé jusqu'à la membrane du tonoplaste. Les pigments pourraient être acétylés préalablement à leur relargage et leur séquestration dans la vacuole.

De manière surprenante, ce rôle semble associé à une GSTU, Bz2, chez le maïs. D'ailleurs Bz2 peut compléter le phénotype de déficience en anthocyanines des lignées mutantes AN9 de pétunia et inversement AN9 peut compléter le phénotype Bz2 (Alfenito *et al.*, 1998). Cet exemple illustre une possible redondance fonctionnelle entre ces deux classes.

De nombreuses études transcriptomiques et protéomiques ont montré que les GSTFs et GSTUs sont des protéines de réponse aux stress. En effet, leur expression est induite en

réponse à des stress tels que l'ajout de xénobiotiques (DeRidder *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2004), ou de phytohormones (Moons 2005), l'infection par des pathogènes (Lieberherr *et al.*, 2003, Sappl *et al.*, 2004) et nombre d'autres stress biotiques et abiotiques (Glombitza *et al.*, 2004). Certaines GSTs sont induites en réponse à une multitude de traitements. Par exemple, les transcrits *GSTU3* et *GSTU4* d'*Oryza sativa* sont induits en réponse à une exposition au nickel, au cobalt, au polyéthylène glycol, au NaCl, au peroxyde d'hydrogène ou au dithiothréitol (Moons 2003). En considérant la nature de ces stress, il semblerait que des changements du statut redox cellulaire puissent être à l'origine de ces variations d'expression. Dans d'autres cas, des GSTFs et GSTUs sont induites plus spécifiquement en réponse à une contrainte donnée. Il est intéressant de noter que des plants transgéniques exprimant certains gènes codant pour des GSTUs présentent une tolérance accrue contre différentes contraintes. Par exemple, lors d'un stress salin, des plants de tabac surexprimant une GSTU de salicorne (*Salicornia brachiata*) présentent de meilleurs taux de germination des graines et de survie que des plants sauvages (Jha *et al.*, 2011). La surexpression de la *GSTU4* de soja dans des plants de tabac entraîne une tolérance accrue à l'exposition à des herbicides de la classe des diphenyl éthers et des chloroacétanilides (Benekos *et al.*, 2010). Ces résultats sont en accord avec le fait que l'expression de la GSTU4 de soja (*Glycine max* L.) est induite suite à une exposition à l'herbicide fluorodifen (diphényle éther) et que la protéine possède *in vitro* une activité de conjugaison du glutathion contre cette même molécule ainsi qu'une activité peroxydase glutathion dépendante (Axarli *et al.*, 2009). L'apparition de ces deux classes dans les génomes d'organismes photosynthétiques est bien antérieure à l'utilisation des produits phytochimiques, en conséquence leurs aptitudes à les détoxifier est probablement une extension de leurs fonctions naturelles. Malheureusement les corrélations entre les régulations transcriptionnelles observées en réponse à un type de stress et d'éventuelles spécificités de fonction n'ont permis que dans de très rares cas de déterminer les fonctions physiologiques précises des GSTFs et des GSTUs.

Les gènes AtGSTF2 et AtGSTF6 sont fortement et rapidement exprimés en réponse à l'attaque de pathogène (Lieberherr *et al.*, 2003). Les fonctions de ces deux gènes sont sans doute parmi les mieux caractérisées puisqu'AtGSTF6 est impliquée dans la synthèse de la camaléxine alors qu'AtGSTF2 participerait à son transport. La camaléxine est un composé antimicrobien de la classe des glucosinolates formée d'un groupement indole auquel est greffé en position 3 un cycle thiazole (Glawischnig 2007). Le groupement indole provient de la conversion du tryptophane en plusieurs étapes par des cytochrome P450s en indole-3-

acétonitrile, molécule sur laquelle du glutathion est conjugué par AtGSTF6 (figure 40). Le GSH conjugué est ensuite transformé en cycle thiazole par des réactions en séries catalysées par des γ -glutamyl-transpeptidases et la phytochélatine synthase pour finalement former la camaléxine (Su *et al.*, 2011). AtGSTF2 est également capable de catalyser la conjugaison du GSU sur l'indole-3-acétonitrile mais dans une moindre mesure. Par contre AtGSTF2 peut lier la camaléxine (Dixon *et al.*, 2011) avec une forte affinité et si l'on considère sa localisation membranaire (Smith *et al.*, 2003), cette protéine pourrait être potentiellement impliquée dans la régulation de son transport et/ou l'export extracellulaire de ce composé (Dixon *et al.*, 2011).

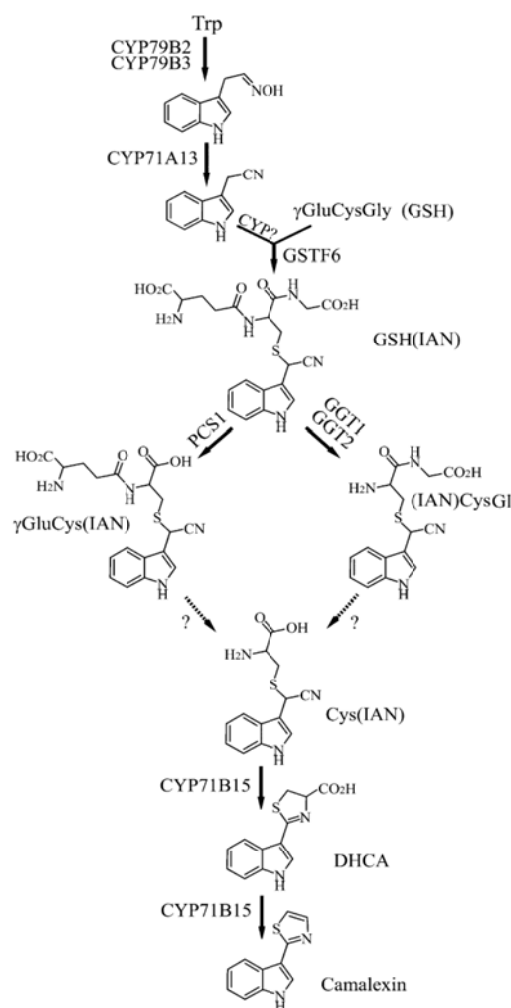


Figure 40 : Modèle hypothétique de la voie de synthèse de la camaléxine chez *A. thaliana* (Su *et al.*, 2011). La camaléxine est dérivée du tryptophane et sa synthèse fait intervenir plusieurs cytochrome P450s (CYP), des γ -glutamyl transpeptidases (GGT), la phytochélatine synthase (PCS1). La GSTF6 catalyse la réaction de conjugaison sur le glutathion indole-3-acétonitrile.

Dans cette voie de biosynthèse, le glutathion est utilisé comme source de soufre et non pas comme « marqueur de dégradation » comme c'est classiquement le cas dans la détoxification des xénobiotiques. Le soufre est retrouvé dans un éventail varié de métabolites secondaire dont les glucosinolates, les dérivés du métabolisme des acides gras et des terpènes, les alliines ou les thiophène (Burow *et al.*, 2008). Dans certains cas, le soufre de ces molécules provient sans aucun doute de l'activité de sulfotransférases (Klein *et al.*, 2004) mais il est tentant de spéculer que le soufre peut avoir pour origine le glutathion. En accord avec cette idée, le 3-mercaptohexanol est un alcane soufré et hydroxylé contribuant au goût de certains fruits et son précurseur de synthèse immédiat est le trans-2-héxenal (Farmer *et al.*, 2003), un produit de dégradation des acides gras qui acquerrait l'atome de soufre via une glutathionylation. C'est en tous cas ce que suggère l'identification de trans-2-héxenal glutathionylé ainsi que de trans-2-héxenal conjugué à une cystéine à partir d'extraits de métabolites de raisins (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002).

Une étude approfondie sur les propriétés de la protéine GSTF2, toujours chez *A. thaliana* suggère que la formation de complexes ligand-protéine permet de moduler directement l'activité catalytique de cette protéine ainsi que son affinité pour d'autres ligands (Dixon *et al.*, 2011). En effet, AtGSTF2 est capable de lier différentes molécules hétérocycles dont des flavonoïdes et la camaléxine avec une forte affinité ($K_d < 1 \mu M$) (Dixon *et al.*, 2011) et lorsqu'elle est complexée avec un ligand (e.g. le lumichrome), elle présente une meilleure affinité envers des dérivés indoles. Cette propriété pourrait être un mécanisme de régulation permettant de moduler l'affinité pour une molécule ou une autre. Cette possibilité est étayée par la caractérisation structurale d'AtGSTF2 et des analyses biochimiques qui ont montré que cette protéine possédait deux sites de liaison de ligands (Reinemer *et al.*, 1996, Smith *et al.*, 2003). Cela peut être important à la vue du lien fonctionnel entre AtGSTF2 et la camaléxine lors d'infection pathogène (Su *et al.*, 2011). Des fonctions non catalytiques sont ici mises en évidence pour les GSTs. Il convient de souligner que la présence de glutathion améliore la capacité ligandine d'AtGSTF2 qui garde donc un lien fonctionnel avec ce tripeptide. D'autre part, l'association d'AtGSTF2 avec certains ligands comme l'harmane ou le lumichrome entraîne une augmentation de l'activité transférase du glutathion de près de 60%. A l'inverse, d'autres études ont montré que certains flavonoïdes comme la quercétine ou la naringinine inhibaient fortement l'activité catalytique des GSTFs (Cummins *et al.*, 2003). Ainsi, la liaison d'un ligand pourrait également avoir une fonction régulatrice sur l'activité catalytique des GSTs.

La GSTF8, toujours chez *A. thaliana*, est capable de conjuguer du glutathion sur les oxylipines (acides gras oxydés) comme l'acide 12-oxophytodiénoïque (OPDA) ou les phytoprostanes de type A1 (Mueller *et al.*, 2008). Ces deux composés sont des molécules « signal » importantes pour la régulation du développement des plantes ainsi que pour la réponse des plantes aux stress. La concentration cellulaire de ces molécules augmente en cas de blessure ou d'infection par des pathogènes (Block *et al.*, 2005, Delker *et al.*, 2006). Il est intrigant de noter que la GSTU19 d'*A. thaliana* ainsi que d'autres GSTs de la classe Tau sont capables de lier l'OPDA glutathionylé mais aussi de le glutathionyler (Dixon *et al.*, 2009). Cette activité sur un même substrat, partagée par des GSTs de la classe Phi et Tau, illustre à nouveau les redondances fonctionnelles possibles entre ces deux classes. La conséquence physiologique de la conjugaison des oxylipines reste incertaine. Cela peut constituer une étape préliminaire nécessaire à leur catabolisme à l'instar des xénobiotiques. Ou encore, la glutathionylation pourrait être requise pour le transport de l'OPDA aux peroxysomes. En effet, cette molécule est un intermédiaire de synthèse de l'acide jasmonique, une phytohormone dont la voie de synthèse prend place entre le chloroplaste, le cytoplasme et les peroxysomes (Leon 2013). L'OPDA est le produit final de la phase chloroplastique et nécessite d'être transporté jusqu'aux peroxysomes. AtGSTF8 possède un peptide d'adressage aux chloroplastes et de nombreuses GSTUs sont cytoplasmiques, il se peut donc que ces GSTs soit impliquées dans le transport de ce métabolite.

Une propriété spécifique aux GSTs de la classe Tau est leur capacité à lier de façon sélective selon l'isoforme des dérivés des acides gras. En effet, la recherche de substrats physiologiques chez *A. thaliana* par capture par affinité a permis de déterminer que les GSTs de cette classe lient des acides gras oxydés et souvent glutathionylés avec une bonne affinité (Dixon *et al.*, 2009). Ces acides gras oxydés constituent chez les plantes des agents antimicrobiens ainsi que des molécules de signalisation connus pour s'accumuler en cas de stress biotiques ou abiotiques (Feussner *et al.*, 2002). Cette étude met également en évidence des préférences des différentes GSTUs testées en fonction non seulement de la longueur de la chaîne aliphatique des acides gras, de leur degré de saturation et d'oxydation mais aussi de la présence d'un adduit glutathion ou non. Ces résultats établissent donc un lien entre les GSTUs et le métabolisme des acides gras. Cependant, la portée physiologique de ces résultats reste à être confirmée bien qu'un rôle de transport de ces molécules qui serait modulé par l'existence de formes glutathionylées puisse être proposé pour ces GSTUs.

A l'exception des exemples précédents, peu de substrats naturels des GSTFs et GSTUs ont été identifiés. Ceci est d'autant plus surprenant au regard du grand nombre d'isoformes composant ces classes et à l'existence de plusieurs voies de dégradation de produits glutathionylés qui suggèrent un nombre potentiellement important de substrats (Dixon *et al.*, 2010). La difficulté d'identifier des composés glutathionylés lors d'extractions de métabolites de plantes peut être expliquée simplement par leur faible abondance mais aussi par des méthodes inadaptées ou une existence très transitoire de ces composés. Ce dernier point pourrait aussi s'expliquer par le fait que les substrats naturels sont modifiés par une addition de Michael qui peut être réversible dans certaines conditions, l'inverse des herbicides glutathionylés qui résultent d'une substitution nucléophile irréversible (Dixon *et al.*, 2010).

Problématiques et objectifs

De nombreuses études biochimiques, protéomiques, transcriptomiques et génétiques réalisées le plus souvent chez *Arabidopsis* ou le peuplier ont montré que les glutathion transférases sont impliquées dans le développement (Jiang *et al.*, 2010), dans les mécanismes de réponse au stress (Su *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2012) et dans le métabolisme secondaire (Dixon *et al.*, 2010). D'autres études ont par ailleurs montré que les GSTs appartenant aux classes Phi et Tau sont parmi les plus régulées tant au niveau transcriptionnel que protéique en réponse aux xénobiotiques (DeRidder *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2004, Tanaka *et al.*, 2007, Brentner *et al.*, 2008), aux hormones (Moons 2005), aux stress environnementaux (Glombitza *et al.*, 2004) ainsi qu'aux infections par des pathogènes (Lieberherr *et al.*, 2003). En dépit de l'existence d'un certain nombre d'études, les fonctions précises des GSTs de ces deux classes ainsi que leurs substrats endogènes ou exogènes restent inconnus dans la plupart des cas.

Ce projet de thèse a été effectué au sein de l'Unité Mixte de Recherche INRA/Université de Lorraine 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) dont les missions de recherche sont d'étudier la biologie et l'écologie des interactions entre micro-organismes et arbres forestiers. Une des espèces modèles de cette unité est *Populus trichocarpa*, un arbre de la famille des salicacées connu sous le nom vernaculaire de peuplier de l'ouest. Son cycle de reproduction relativement court, sa croissance rapide, son abondance dans les écosystèmes naturels, son relativement petit génome, sa capacité à être génétiquement transformé et cultivé *in vitro* sont autant de critères qui ont permis au peuplier de s'imposer comme espèce modèle (Jansson *et al.*, 2007). Les nombreuses applications industrielles liées à l'utilisation de son bois expliquent les grandes surfaces dédiées à la populiculture. Diverses maladies touchent les peupleraies cultivées dont l'agent de la rouille du peuplier causé par le champignon *Melampsora larici-populina*, qui est présent dans toute l'Europe, et particulièrement dans les régions du nord de la France. Cette infection entraîne notamment d'importants retards de croissance ainsi qu'une défoliation précoce des arbres induisant des chutes considérables de rendement chez les peupliers allant jusqu'à 50% (Paillassa 2006). A ce jour, cette maladie est considérée comme l'un des problèmes sanitaires majeurs menaçant les peupleraies européennes. L'analyse des transcrits de feuilles de peuplier infectées par le champignon *Melampsora larici-populina*, a montré une forte augmentation de l'expression de certaines GSTs des classes Phi et Tau (Rinaldi *et al.*, 2007). De façon similaire, lorsque la plante *Arabidopsis* est infectée par *Peronospora parasitica*, l'expression de certaines GSTs des classes Phi et Tau est fortement stimulée (Wagner *et al.*, 2002), suggérant fortement que les GSTs appartenant à ces deux classes participent activement à la résistance de l'hôte contre les

pathogènes. L'étude de ces GSTs s'inscrit donc parfaitement dans les thématiques de recherche de l'unité. L'analyse *in silico* de nombreux génomes de plantes a montré que les classes Tau et Phi étaient représentées par un nombre important de copies de gènes, ce qui rend *a priori* leur caractérisation complexe car ces expansions de classe génèrent souvent de la redondance fonctionnelle. Le génome du peuplier compte 8 isoformes de GST de la classe Phi. L'objectif principal de ce projet de thèse a été de caractériser toutes les isoformes des GSTs de la classe Phi d'un point de vue structural et fonctionnel afin de mieux comprendre leurs rôles et d'explorer en détail la redondance fonctionnelle au sein de cette classe.

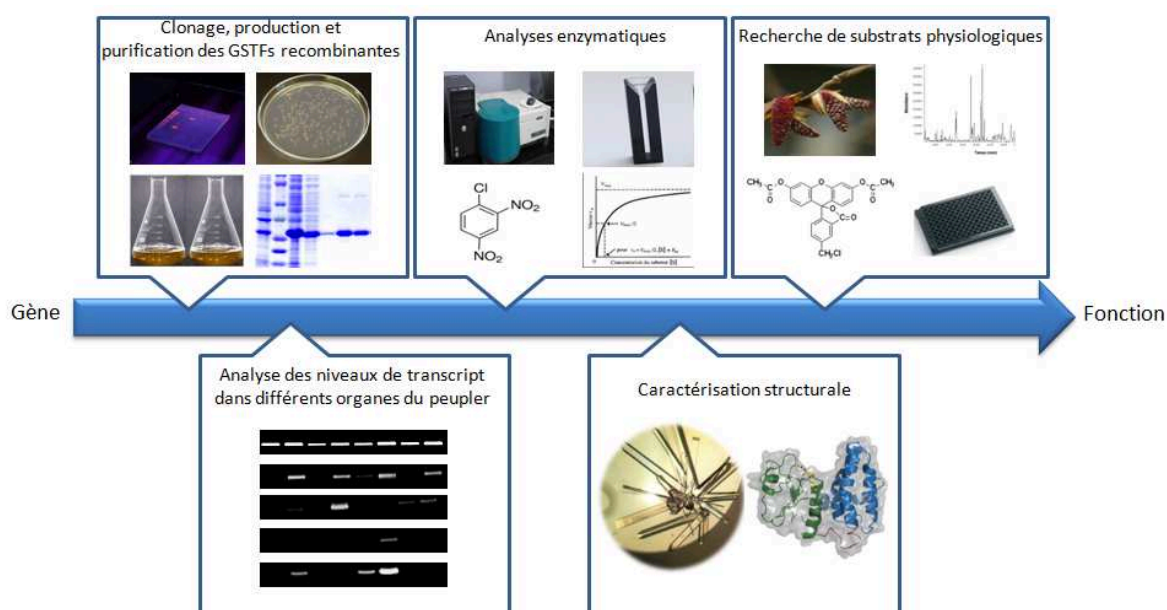


Figure 41 : Stratégie de mes travaux de thèse

Les résultats obtenus seront consignés dans 3 chapitres. Le chapitre 1, présenté sous la forme d'un article publié, décrit essentiellement la caractérisation biochimique et structurale de la GSTF1. Le chapitre 2 présenté sous la forme d'un projet de publication décrit le même travail réalisé sur les 7 autres isoformes. Le chapitre 3 présente des résultats complémentaires concernant la recherche de substrats de ces GSTs au sein de mélanges de métabolites extraits de différents organes de peuplier. Afin d'éviter une trop forte redondance avec les résumés, introductions et discussions déjà présents dans les articles, leur présentation sera maintenue volontairement succincte.

Article 1: The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1

Henri Pégeot, Cha San Koh , Benjamin Petre, Sandrine Mathiot, Sébastien Duplessis, Arnaud Hecker, Claude Didierjean et Nicolas Rouhier

Frontiers in plant science, 2014, 5, 712

Après une analyse phylogénétique des GSTFs chez les plantes et l'étude des niveaux d'expression transcriptionnels des 8 GSTFs dans différents organes de peuplier, ce travail se focalise sur la caractérisation structurale, biochimique et enzymatique de la GSTF1 et de variants mutés pour des résidus catalytiques. Par ailleurs, sur la base de résultats montrant une régulation transcriptionnelle du gène *GSTF1*, les niveaux protéiques de cette isoforme ont été évalués par western blot dans le pathosystème peuplier-*Melampsora larici-populina*.

Article 2 : The structural and sequence permissiveness in the glutathione transferase Phi class: natural combination of catalytic residues confers dual biochemical functions

Henri Pégeot, Sandrine Mathiot, Thomas Perrot, Frédéric Gense, Arnaud Hecker, Claude Didierjean, Nicolas Rouhier

Les résultats présentés dans cet article explorent la redondance fonctionnelle entre les GSTs de classe Phi du peuplier à travers la caractérisation biochimique et structurale des sept autres isoformes. Assez peu de différences entre les isoformes sont visibles au niveau structural, les différences observées au niveau catalytique résident donc principalement dans la nature des résidus formant le motif à 4 résidus typique des protéines de la superfamille des TRXs.

Chapitre 3 : Vers l'identification et la caractérisation des substrats des glutathion transférases de la classe Phi de peuplier *Populus trichocarpa*

Sur la base des résultats et des outils générés, un travail d'isolement et d'identification de substrats ou ligands naturels a été entrepris afin de comprendre les rôles cellulaires associés à certaines de ces GSTFs. Les métabolites issus d'organes (fleurs mâles et femelles, feuilles et bourgeons) où les GSTFs sont principalement exprimées ont été extraits par macération ou à l'aide d'un extracteur de Soxhlet. La composition générale de ces différents

extraits a d'abord été caractérisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les substrats ou ligands potentiels des 8 isoformes de GSTFs ont alors été recherchés à partir de ces extraits par 2 types d'approches : analyse de la thermostabilité des protéines et effet inhibiteur sur l'activité estérase de ces enzymes.

Résultats

5. Article 1: The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1

Henri Pégeot, Cha San Koh , Benjamin Petre, Sandrine Mathiot, Sébastien Duplessis, Arnaud Hecker, Claude Didierjean et Nicolas Rouhier

Frontiers in plant science, 2014, 5, 712



The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1

Henri Pégeot^{1,2}, Cha San Koh^{3,4†}, Benjamin Petre^{1,2†}, Sandrine Mathiot^{3,4}, Sébastien Duplessis^{1,2}, Arnaud Hecker^{1,2}, Claude Didierjean^{3,4} and Nicolas Rouhier^{1,2*}

¹ Interactions Arbres - Microorganismes, Université de Lorraine, UMR1136, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

² INRA, Interactions Arbres - Microorganismes, UMR1136, Champenoux, France

³ Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine, CRM², Equipe BioMod, UMR 7036, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁴ Faculté des Sciences et Technologies, CNRS, CRM², Equipe BioMod, UMR 7036, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Edited by:

Stanislav Kopriva, University of Cologne, Germany

Reviewed by:

Georg Groth, University of Duesseldorf, Germany
Wayne Snedden, Queen's University, Canada

*Correspondence:

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

† Present address:

Cha San Koh, RNA Therapeutics Institute, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA;
Benjamin Petre, The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK

Glutathione transferases (GSTs) constitute a superfamily of enzymes with essential roles in cellular detoxification and secondary metabolism in plants as in other organisms. Several plant GSTs, including those of the Phi class (GSTFs), require a conserved catalytic serine residue to perform glutathione (GSH)-conjugation reactions. Genomic analyses revealed that terrestrial plants have around ten GSTFs, eight in the *Populus trichocarpa* genome, but their physiological functions and substrates are mostly unknown. Transcript expression analyses showed a predominant expression of all genes both in reproductive (female flowers, fruits, floral buds) and vegetative organs (leaves, petioles). Here, we show that the recombinant poplar GSTF1 (PttGSTF1) possesses peroxidase activity toward cumene hydroperoxide and GSH-conjugation activity toward model substrates such as 2,4-dinitrochlorobenzene, benzyl and phenetyl isothiocyanate, 4-nitrophenyl butyrate and 4-hydroxy-2-nonenal but interestingly not on previously identified GSTF-class substrates. In accordance with analytical gel filtration data, crystal structure of PttGSTF1 showed a canonical dimeric organization with bound GSH or 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid molecules. The structure of these protein-substrate complexes allowed delineating the residues contributing to both the G and H sites that form the active site cavity. In sum, the presence of GSTF1 transcripts and proteins in most poplar organs especially those rich in secondary metabolites such as flowers and fruits, together with its GSH-conjugation activity and its documented stress-responsive expression suggest that its function is associated with the catalytic transformation of metabolites and/or peroxide removal rather than with ligandin properties as previously reported for other GSTFs.

Keywords: glutathione transferase, protein structure, crystallography, *Populus*, enzyme characterization, transcript profiling

INTRODUCTION

Glutathione transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) represent a ubiquitous multigenic family of enzymes that conjugate the reduced tripeptide glutathione (GSH, γ -Glu-Cys-Gly) on a wide range of endogenous and exogenous electrophilic molecules (Hayes et al., 2005). From the most recent genomic and phylogenetic analyses, the GST family is subdivided into 14 classes in photosynthetic organisms: Phi (F), Tau (U), Theta (T), Zeta (Z), Lambda (L), Hemerythrin (H), Iota (I), Ure2p, glutathionyl-hydroquinone reductase (GHR), elongation factor 1B Gamma (EF1B γ), dehydroascorbate reductase (DHAR), tetrachlorohydroquinone dehalogenase (TCHQD), metaxin, microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mpges-2) (Lallement et al., 2014a). Behind Tau GSTs, Phi GSTs (GSTFs) represent the second largest class in plants and this expansion probably results from several rounds of gene duplication (Lan et al., 2009). This class is often presented in the literature as plant-specific, however, basidiomycetes also possess GSTFs (Morel et al., 2013).

Along with GSTUs, plant GSTFs have been extensively studied for their involvement in herbicide detoxification and for this reason they could be considered as the counterparts of the mammalian drug metabolizing GSTs. By catalyzing GSH-conjugation reactions of electrophilic molecules that are subsequently recognized by vacuolar ABC transporters, GSTFs participate to the vacuolar sequestration and thus detoxification of exogenous compounds. However, other biochemical activities can account for the observed increased herbicide resistance. For instance, it was shown that the GSTF1 from the black grass *Alopecurus myosuroides*, a weed of cereals, possesses a glutathione peroxidase activity which lowers the levels of hydroperoxides produced in response to herbicides (Cummins et al., 1999). *Arabidopsis thaliana* transgenic plants expressing this GSTF1 acquire multiple herbicide resistance and accumulate protective flavonoids as initially observed in the black grass (Cummins et al., 2009, 2013). Another facet of GSTs is their involvement in secondary metabolism, in stress response and in their associated signaling. For instance, *A. thaliana* GSTF6 is required for the synthesis

of the defense compound camalexin, by catalyzing the conjugation of glutathione onto indole-3-acetonitrile (Su et al., 2011) whereas *A. thaliana* GSTF2 binds tightly to camalexin and might be required for its transport (Dixon et al., 2011). On the other hand, *A. thaliana* GSTF8 catalyzes glutathione conjugation to prostaglandin 12-oxophytodienoic acids and A₁-phytoprostanes, two stress signaling molecules (Mueller et al., 2008). Consistent with these functions, the expression of *GST* gene belonging to all classes is often highly induced in response to biotic and abiotic stresses or to hormone treatments, and this often correlated with an increase in the protein amount. For instance, the expression of several *GSTF* genes is enhanced in response to plant hormones such as ethylene, methyl jasmonate, salicylic acid and auxin, to herbicides and to herbicide safeners, to pathogen infection, and more generally to treatments leading to oxidative stress (Deridder et al., 2002; Wagner et al., 2002; Lieberherr et al., 2003; Smith et al., 2003, 2004; Sappl et al., 2004, 2009).

Interestingly, previous biochemical analyses have shown that GSTFs can bind to metabolites for non-catalytic functions. The best characterized example of carrier/transport functions for a Phi GST concerns the requirement of *A. thaliana* transparent testa 19 (tt19)/AtGSTF12 and of the petunia ortholog AN9 for the correct vacuolar localization of anthocyanins and proanthocyanidins (Alfenito et al., 1998; Kitamura et al., 2004). While it was initially thought that these GSTFs could catalyze GSH-conjugation reactions, it was determined that they serve as flavonoid carrier proteins (Mueller et al., 2000). Moreover, photoaffinity-labeling experiments or competition activity assays pointed to the capacity of GSTFs to bind plant hormones such as gibberellic acid (Axarli et al., 2004), cytokinin and auxin (Bilang et al., 1993; Bilang and Sturm, 1995; Gonneau et al., 2001). A screen for metabolites able to bind to *A. thaliana* GSTF2, either from pure molecules or from plant or *Escherichia coli* extracts also identified other interacting molecules. Besides camalexin, flavonoids (quercetin, quercetin-3-O-rhamnoside and kaempferol) and other heterocyclic compounds structurally close to flavonoids (harmane, norharmane, indole-3-aldehyde, and lumichrome) have been shown to bind to AtGSTF2 (Smith et al., 2003; Dixon et al., 2011). The absence of GSH-conjugation activity with these compounds indicated that AtGSTF2 functions as a carrier protein. Moreover, competition binding experiments or activity assays in the presence of several of these binding molecules showed that they either did not alter AtGSTF2 conjugating activity or even increased it, hinting the existence of multiple ligand/substrate binding sites.

At the structural level, GSTFs exist as homodimers, the dimerization interface involving mainly hydrophobic surface patches (Armstrong, 1997). Each monomer comprises an active site region formed by a glutathione binding pocket (G-site) primarily involving residues from the conserved N-terminal thioredoxin domain and an hydrophobic pocket (H-site) primarily involving residues from the less conserved C-terminal domain (Prade et al., 1998). In their active sites, most GSTFs present a serine residue that is located in the N-terminal end of the α 1 helix which promotes the formation of the active thiolate anion on the sulphhydryl group of the cysteine of GSH that is required for catalysis. However, the non-catalytic functions observed for

some GSTFs suggested the existence of a ligandin site (L-site) but structural details of the latter are still lacking. From mutagenesis experiments performed on *Zea mays* GST-I, the L-site is likely overlapping with the G- and H-sites (Axarli et al., 2004).

In this study, the transcript levels of the eight poplar *GSTFs* have been analyzed in various organs. Then, the biochemical and structural properties of the stress-responsive GSTF1 have been further characterized, examining the enzymatic properties of recombinant proteins (WT protein and variants mutated for the catalytic serine) and solving the 3D structure of the protein in complex with substrates/ligands.

MATERIALS AND METHODS

GENOMIC AND PHYLOGENETIC ANALYSES

In order to identify all poplar *GSTF* genes, homology searches with the BLAST algorithm have been performed on the different versions of the *P. trichocarpa* genome including the version 3.0 available on the phytozome v10 portal (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Genome analyses for other terrestrial plants have been also performed on the phytozome v10 portal whereas cyanobacterial and algal genomes have been analyzed from cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) and the JGI genome portal (<http://genome.jgi.doe.gov>) respectively. The protein sequences and corresponding accession numbers can be found as Supplementary Table 1. When possible, *GSTF* sequences were corrected on the basis of available ESTs.

BIOLOGICAL MATERIAL, GROWTH CONDITIONS, AND INOCULATION PROCEDURES

Hybrid poplar cultivar ‘Beaupré’ (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*) greenhouse cultivation, *Melampsora larici-populina* urediniospore multiplication and leaf inoculation procedures were done as previously described (Rinaldi et al., 2007). The *M. larici-populina* isolates used in this study are 98AG31 (pathotype 3-4-7) and 93ID6 (pathotype 3-4) respectively virulent and avirulent on “Beaupré.” Poplar organs have been harvested from a naturally growing male and female *P. trichocarpa* adult trees found on the faculty of sciences campus located in Vandoeuvre-lès-Nancy (France).

RT-PCR EXPERIMENTS

Total RNAs were extracted from 150 mg of *P. trichocarpa* stems, male flowers, female flowers, fruits, petioles, leaves, buds, and roots using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to the Manufacturer’s instructions with minor modifications described before (Lallement et al., 2014b). Then, mRNAs were reverse-transcribed to obtain cDNAs by using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) following the manufacturer’s instructions. PCR amplifications were performed for 25, 30, or 35 cycles using Go-Taq polymerase (Promega). Specific forward and reverse primers (Supplementary Table 2) have been designed to amplify ca 300 bp fragments of each *GSTF* gene. The ubiquitin gene (Potri.015G013600) was used as a control of the cDNA concentration used for PCR amplification and incidentally of cDNA integrity (Lallement et al., 2014b). The PCR products have been separated by electrophoresis on 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

PROTEIN EXTRACTION AND WESTERN-BLOT ANALYSIS

Extraction of soluble proteins from leaves, petioles, stems, roots, fruits, stamens, and buds or from rust-infected leaves was performed as previously described (Vieira Dos Santos et al., 2005). The proteins were separated by 15% SDS-PAGE and electro-transferred onto nitrocellulose membranes (LI-COR Biosciences). After rinsing in 13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 0.2 mM KH₂PO₄ buffer (phosphate buffered saline: PBS), membranes were blocked during 45 min at room temperature using the Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences). Then, membranes were incubated with rabbit polyclonal antibodies (diluted 1:1000, synthesis by Genecust) raised against PttGSTF1 for 30 min in the presence of 0.05% of tween 20. After several washing steps with a PBS buffer supplemented with 0.05% tween 20 (PBST), membranes were incubated for 30 min with IRDye 800 CW goat or donkey anti-rabbit secondary antibodies (LI-COR Biosciences) diluted 1:5000 in the Odyssey blocking buffer supplemented with 0.05% tween 20 and 0.01% SDS. After extensive washes with PBST and PBS, immunodetection of proteins on the membrane was performed by exciting the IRDye with an Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences).

PCR CLONING AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

The sequence coding for GSTF1 was amplified by PCR from *Populus tremula* × *P. tremuloides* leaf cDNAs using specific forward and reverse primers (Supplementary Table 2) and cloned into pET-3d between *Nco*I and *Bam*HI restriction sites. Hence, the sequence is subsequently referred to as PttGSTF1. PttGSTF1 S13C and PttGSTF1 S13A variants where the serine found at position 13 is substituted into cysteine or alanine were generated by site-directed mutagenesis using two complementary mutagenic primers (Supplementary Table 2). Two overlapping mutated fragments were generated in a first PCR reaction and were subsequently used in a second PCR to generate the full-length mutated sequences which have been then cloned into pET-3d.

HETEROLOGOUS EXPRESSION IN *E. COLI* AND PURIFICATION

PttGSTF1 expression was performed in an *E. coli* BL21 (DE3) strain (Novagen) containing the pSBET plasmid upon transformation with the recombinant pET-3d plasmids. Bacteria were cultivated at 37°C in LB medium containing kanamycin (50 µg/ml) and ampicillin (50 µg/ml). When the cell culture reached an OD_{600nm} of 0.7, PttGSTF1 expression was induced by the addition of 0.1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and cells were further grown for 4 h. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl buffer and stored at −80°C. Cell lysis was achieved by two rounds of 1 min sonication. The cell extract was then centrifuged at 40,000 g for 30 min at 4°C to remove cellular debris and aggregated proteins. The fraction precipitating between 40 and 80% of the saturation in ammonium sulfate was subjected to a size-exclusion chromatography by loading the protein extract on an Ultrogel® ACA44 (5 × 75 cm, Biosepra) column equilibrated with 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl buffer. The fractions containing the recombinant protein were then pooled, dialyzed by ultrafiltration in

Amicon cells using a YM10 membrane (Millipore) and loaded onto a DEAE-cellulose column (Sigma Aldrich) equilibrated in 30 mM Tris-HCl pH 8.0. The proteins were eluted using a 0–400 mM NaCl gradient, concentrated by ultrafiltration and stored in 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl buffer. The protein purity was then analyzed by 15% SDS-PAGE and protein concentration was determined after measuring the absorbance at 280 nm using a theoretical molar absorption coefficient of 33,982 M^{−1} cm^{−1} for PttGSTF1, PttGSTF1 S13C, and PttGSTF1 S13A.

DETERMINATION OF THE MOLECULAR MASS AND OLIGOMERIZATION STATE OF PURIFIED RECOMBINANT PROTEINS

The molecular masses of purified recombinant proteins were analyzed using a Bruker microTOF-Q spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an Apollo II electrospray ionization source as described previously (Couturier et al., 2011). The oligomerization state of purified recombinant proteins was analyzed on a Superdex 200 10/300 column equilibrated in 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl and connected to an Akta purifier system (GE Healthcare) by injecting 100 µg of purified recombinant proteins at a flow rate of 0.5 ml/min. The column was calibrated using the molecular weight standards (6500–700,000 Da) from Sigma.

ENZYMATIC ACTIVITIES

The GSH-conjugation activity toward phenethyl isothiocyanate (PITC), benzyl isothiocyanate (BITC), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), 4-nitrophenyl butyrate (PNP-butyrate) was assayed at 25°C by following absorbance at 274 nm for isothiocyanate derivatives, or at 224, 340, 412 nm for HNE, CDNB, and PNP-butyrate respectively. Reactions were carried out in 500 µL of 100 mM phosphate buffer pH 6.5 for both isothiocyanate derivatives and HNE; 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 for PNP-butyrate and 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA for CDNB. Various concentrations of PITC (50–500 µM), HNE (12.5–125 µM), CDNB (500–6000 µM), BITC (100–1000 µM) or PNP-butyrate (50–3000 µM) have been tested at a fixed GSH concentration of 1 mM. When using HNE as a substrate, the GSH concentration was fixed at 0.7 mM to limit interferences with the detection of HNE at 224 nm.

Thiol-transferase, dehydroascorbate (DHA) reductase and peroxidase activities have been measured toward 2-hydroxyethyl disulfide (HED), DHA, and cumene hydroperoxide (CuOOH) or tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) respectively using an NADPH-coupled spectrophotometric method. The reactions were carried out at 25°C in 500 µL of 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA buffer containing 150 µM NADPH, 0.5 units of yeast glutathione reductase and various concentrations of HED (25–1000 µM), DHA (250–5000 µM), CuOOH (500–6000 µM), t-BOOH (250–5000 µM) at a fixed GSH concentration of 2 mM.

For all these assays, reactions were started by the addition of the enzyme and protein concentrations used were within the linear response range. The measured velocities were corrected by subtracting the rate of spontaneous non-enzymatic reaction and

three independent experiments were performed at each substrate concentration. Changes in absorbance were followed with a Cary 50 spectrophotometer (Agilent Technologies). The kinetic parameters (k_{cat} and apparent K_m) were obtained by fitting the data to the non-linear regression Michaelis–Menten model in GraphPad Prism 5 software. The k_{cat} values are expressed as μmol of substrate oxidized per second per μmol of enzyme (i.e., the turnover number in s^{-1}), using specific molar absorption coefficients of $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 340 nm for NADPH, $8890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 274 nm for PITC, $9250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 274 nm for BITC, $9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 340 nm for CDNB, $17700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 412 nm for PNP-butyrate and $13750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 224 nm for HNE.

CRYSTALLIZATION AND STRUCTURE DETERMINATION OF PttGSTF1 AND PttGSTF1 S13C

Initial screening of crystallization conditions was carried out by the microbatch-under-oil method. Sitting drops were set up using $1 \mu\text{l}$ of a 1:1 mixture of protein and crystallization solutions (672 different commercially available conditions) in Terasaki microbatch multiwell plates (Molecular Dimensions). The crystallization plates were stored at 4°C . Single crystals of sufficient size were obtained using Jena Bioscience 2D1 condition (30% w/v PEG 4000, 100 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) sodium salt, pH 6.5). Best crystals were obtained with a protein concentration of 14 mg/ml for PttGSTF1 and of 10 mg/ml for PttGSTF1 S13C. The single crystals were flash-cooled in liquid nitrogen using a mixture of the crystallization solution and 20% glycerol as cryoprotectant. For PttGSTF1, before crystallization, the protein (*ca* 1 mL at 600 μM) was treated with 10 mM GSH for 30 min, desalted on G25 columns and concentrated to the indicated concentration using Amicon Ultra centrifugal filters, Ultracel 10 K Membrane from Millipore.

PttGSTF1 X-ray diffraction data were collected on beamline EMBL-X11 at the DORIS storage ring (DESY, Hamburg, Germany) and PttGSTF1 S13C X-ray diffraction data were collected on beamline BM30A at synchrotron ESRF (Grenoble, France). PttGSTF1 and PttGSTF1 S13C diffraction images were integrated with the program HKL2000 (Otwinowski and Minor, 1997) and the program XDS (Kabsch, 2010), respectively. Crystallographic calculations were carried out with programs from the CCP4 program suite (Winn et al., 2011). The structure of PttGSTF1 was solved by the molecular replacement method with the program Molrep (Vagin and Teplyakov, 2010) using *A. thaliana* GSTF2 as a template (PDB code: 1GNW). PttGSTF1 and PttGSTF1 S13C structures were refined by alternate cycles of restrained maximum-likelihood refinement with the program Phenix (Adams et al., 2010) and manual adjustments were made to the models with Coot (Emsley et al., 2010). The crystal parameters, data statistics, and final refinement parameters are shown in Table 1. All structural figures were generated with PyMol Molecular Graphics System (Schrödinger, LLC). The atomic coordinates and structure factors (codes 4RI6 and 4RI7 for PttGSTF1 and PttGSTF1 S13C, respectively) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

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

	PttGSTF1	PttGSTF1 S13C
DATA COLLECTION		
Space group	$P2_12_12_1$	
Nb of monomers in the ASU ^a	2	
Cell dimensions a, b, c (Å)	58.84 65.94 109.84	55.30 60.65 119.90
Resolution (Å)	18.28–1.52 (1.55–1.52) ^b	40.86–1.80 (1.90–1.80)
Rmerge	0.034 (0.20)	0.124 (0.614)
Mean I/ σ (I)	40.6 (8.4)	11.7 (2.1)
Completeness (%)	99.2 (95.2)	96.5 (79.0)
n observations	7,26,145 (29,691)	2,41,669 (17,902)
Average redundancy	11.0 (9.0)	6.6 (4.2)
Wilson B factor (Å ²)	19.4	14.8
REFINEMENT		
Resolution (Å)	18.28–1.52 (1.54–1.52)	40.86–1.80 (1.85–1.80)
n reflections	65,579 (2554)	36,817 (2118)
Cutoff	$F > 0\sigma(F)$	$F > 0\sigma(F)$
Rall (%) ^c	15.3	15.3
Rfree (%) ^c	18.3 (19.6)	19.5 (28.9)
Average B-factor (Å ²)		
Protein atoms	24.2	18.5
Ligand atoms	25.8	17.2
Solvent atoms	35.8	29.2
Ramachandran statistics (%)		
Residues in preferred regions	98.6	97.9
Residues in allowed regions	1.2	1.9
Outlier residues	0.2	0.2
R.m.s. ^d deviations		
Bond length (Å)	0.009	0.01
Bond angle (°)	1.26	1.3

^aASU, Asymmetric unit.

^bValues in parentheses are for highest resolution shell.

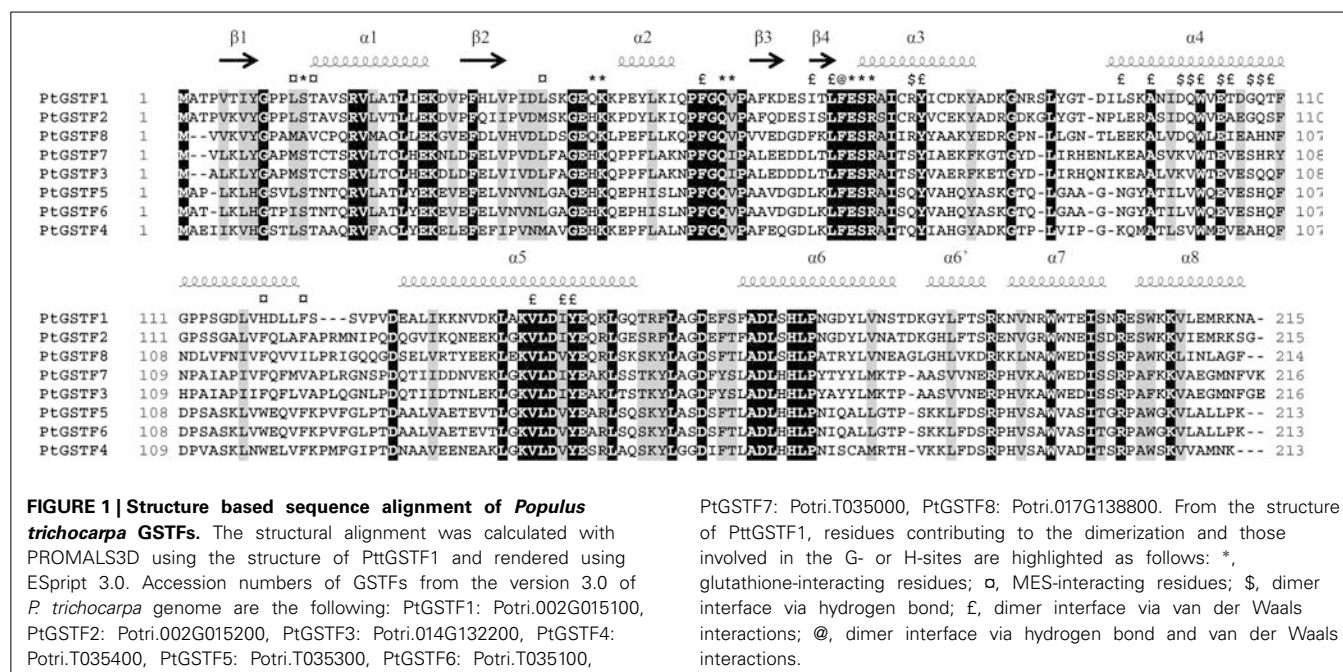
^cRall was determined from all the reflections (working set + test set) whereas Rfree corresponds to a subset of reflections (test set).

^dR.m.s.: Root mean square.

RESULTS

PHYLOGENETIC AND SEQUENCE ANALYSES OF *P. TRICHOCARPA* GSTFs

In silico analysis of the various versions of *P. trichocarpa* genome led to the identification of eight genes coding for GSTFs. All the *P. trichocarpa* GSTF genes encode predicted proteins with a size ranging from 213 to 218 amino acids (Figure 1). None of these sequences exhibits a targeting sequence, suggesting a cytosolic localization. Based on sequence similarities and phylogenetic analysis, four subgroups can be distinguished in poplar: PtGSTF1/2, PtGSTF3/7, PtGSTF4/5/6, and PtGSTF8 (Figures 1, 2). In terms of sequence similarity, the percentage identity within a subgroup ranges from 65 to 98% whereas it is comprised between 40 and 48% between subgroups. The protein similarity somehow reflects the gene arrangement since *PtGSTF1*



and *PtGSTF2* genes are present in tandem on chromosome 2, *PtGSTF4*, 5, 6, and 7 genes cluster on the scaffold 36, whereas *PtGSTF3* and *PtGSTF8* are found at isolated loci on the chromosomes 14 and 17, respectively. Hence, the only peculiarity is the genomic association of *PtGSTF7* with *PtGSTF4*, 5, 6 whereas the sequence proximity to *PtGSTF3* suggested a common origin. The sequence differences between members of each group are also visible by looking to the four amino acid signature typical of proteins of the thioredoxin superfamily and containing the catalytic serine. Indeed, PtGSTF1 and PtGSTF2 display a STAV active site motif, PtGSTF3 and 7 a STCT motif and PtGSTF4, 5, and 6 display STAA or STNT motifs (Figure 1). PtGSTF8 is clearly particular since it has an alanine (AVCP motif) instead of the catalytic serine. This is not specific to the poplar isoform as this particularity is found in several plant orthologs, including the petunia AN9 protein for example.

An exhaustive search of GSTF homologs in available genomes from photosynthetic organisms indicated that GSTF genes are absent in cyanobacteria and green algae. On the other hand, there are considerable variations in the number of genes in terrestrial plants since there is only one gene in *Selaginella moellendorffii* but 27 predicted genes in *Aquilegia coerulea* (Supplementary Table 1). However, the average number of genes is close to 10. A phylogenetic tree constructed using the 400 retrieved sequences (Figure 2) shows several distinct clades that can be distinguished according to the protein active site signature even though some groups can be also differentiated on the basis of the presence of C-terminal or N-terminal extensions. The sequences identified in *P. patens* and *S. moellendorffii*, which are supposed to represent the ancestral versions, form an isolated clade and do not display a clear consensus active site motif. The four subgroups observed for poplar GSTFs are found again in the phylogenetic tree and fell within separate clades. It is worth noting that PtGSTF8 stands out within a clade containing proteins lacking the catalytic serine

but displaying a conserved cysteine residue two residues away (AxC motif). Interestingly, this cysteine is also found in PtGSTF3 and PtGSTF7 and in all orthologs of the same clade whereas the catalytic serine is present.

Overall this indicates that numerous species-specific duplication events occurred during evolution and this raises the question of the appearance of the GSTF group in photosynthetic organisms since it appears to be an innovation specifically found in terrestrial plants. Moreover, the divergences observed in the active site signatures suggest that the proteins may have different properties.

TRANSCRIPT EXPRESSION OF GSTFs IN POPLAR ORGANS

In order to determine whether the expression territories could allow discriminating GSTF genes, RT-PCR experiments were performed from different tissues of an adult, naturally-growing *P. trichocarpa* individual. Experiments were performed with 25, 30, or 35 amplification cycles in order to examine gene expression in the linear range of PCR amplification. The best detection was obtained after 30 cycles as transcripts were barely detected at 25 cycles whereas the signal for some genes was saturated at 35 cycles. All GSTF transcripts were weakly detected in roots and in the male reproductive organ either as whole (male flower) or in stamen, whereas they were all detected in female flowers, fruits, petioles, leaves, and buds (Figure 3). Moreover, the *GSTF1*, *F2*, *F5*, *F6*, and *F7* genes are globally more expressed than *GSTF3*, *F4*, and *F8* genes. Comparing the expression of duplicated genes, we observed that they generally have the same expression profiles although variations in transcript abundance can sometimes be observed. A difference between *PtGSTF1* and *PtGSTF2* transcripts is the presence of *PtGSTF2* in male flowers. In the *PtGSTF4*/*F5*/*F6* subgroup and incidentally among all GSTFs tested, *PtGSTF5* is the most expressed in male flowers/stamen and in roots together with *PtGSTF7*.

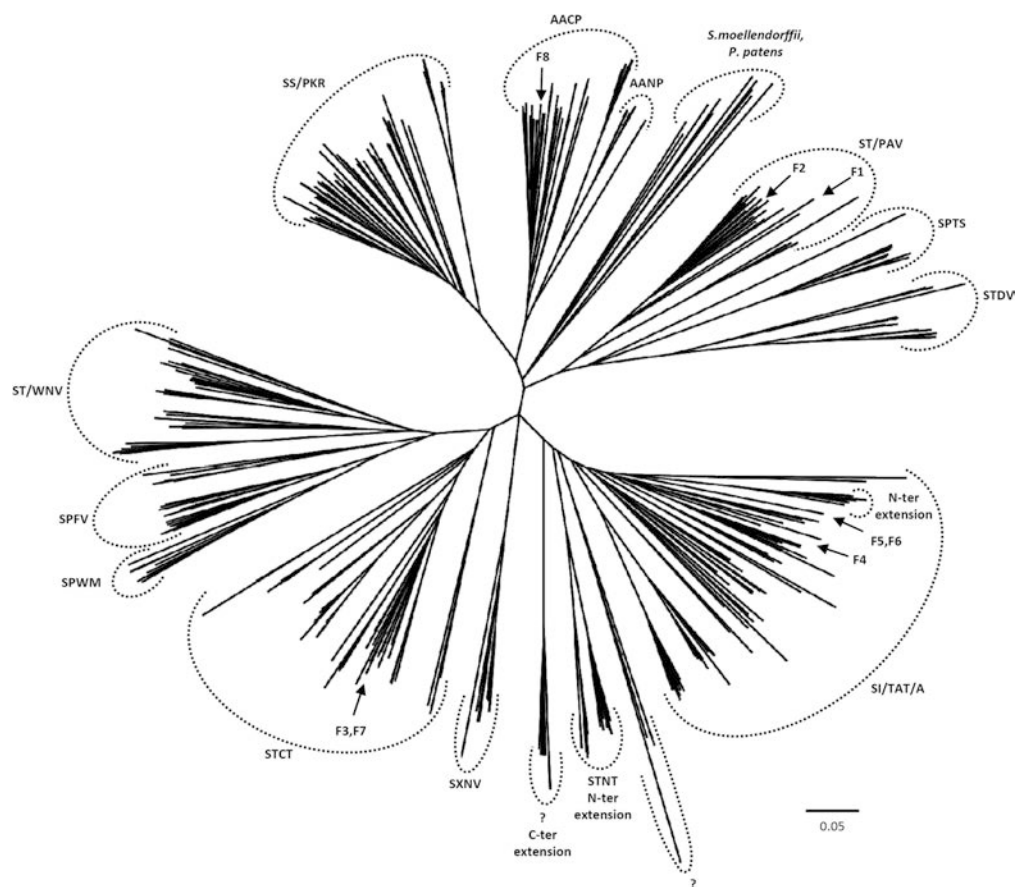


FIGURE 2 | Unrooted phylogenetic tree of GSTFs from terrestrial plants. The alignment was performed with PROMALS3D using 1BYE, 1AXD, 1AW9, 1GNV, and 1BX9 protein structure models as templates. The alignment was subsequently manually adjusted by using Seaview software. Phylogenetic tree was built with BioNJ and edited with Figtree software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Five hundred bootstrap replicates were performed in

order to test the robustness of the tree. The scale marker represents 0.05 substitutions per residue. Sequence names have been removed for clarity but all sequences used are available as Supplementary Table S1. For each major branch, the consensus active site signature containing the catalytic residue is indicated, x is used when the variability is too high. *P. trichocarpa* isoforms have been indicated by an arrow on the tree (F1–F8).

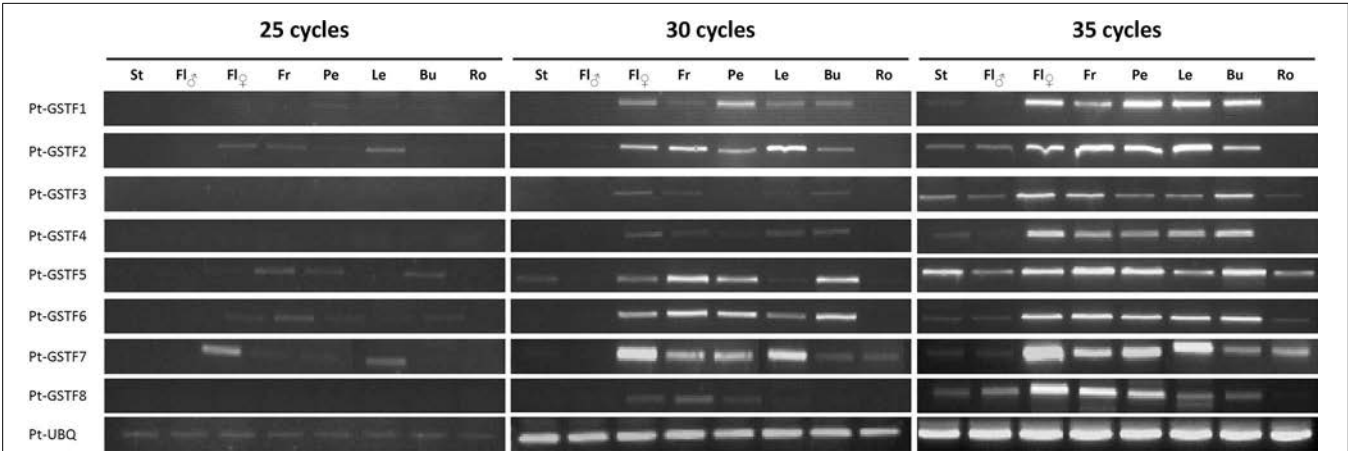


FIGURE 3 | Transcript accumulation of GSTFs in poplar organs. RT-PCR experiments were performed using cDNAs from stamens (St), male flowers (Fl♂), female flowers (Fl♀), fruits (Fr), petioles (Pe), leaves (Le), buds (Bu), and roots (Ro). Ubiquitin was used as a reference gene.

PTGSTF1 PROTEIN ACCUMULATES IN ALL ORGANS ANALYZED BUT ITS LEVEL IS NOT AFFECTED IN LEAVES INFECTED BY THE RUST FUNGAL PATHOGEN *MELAMPSORA LARICI-POPULINA*

In the subsequent parts, we focused our analysis on poplar GSTF1 since several studies showed that it is regulated in many stress conditions. For instance, it is up-regulated in poplar leaves exposed to the tent caterpillar *Malacosoma disstria* (Ralph et al., 2006), in root apices of drought-sensitive (Soligo) and tolerant (Carpaccio) poplar cultivars and in leaves of Carpaccio cultivar subjected to a water deficit (Cohen et al., 2010) and in leaves of 2 month-old *P. trichocarpa* cuttings treated with CDNB or H₂O₂ (Lan et al., 2009). Contrasting results have been obtained in the case of poplar infection by rust fungi, GSTF1 was found to be up-regulated in some (Miranda et al., 2007) but not all studies (Rinaldi et al., 2007; Azaiez et al., 2009). Besides, proteomic studies pointed to an increased GSTF1 protein level in roots of *Populus tremula* exposed to a cadmium stress (Kieffer et al., 2009) and in leaves of *Populus cathayana* male cuttings exposed to chilling or salt stresses (Chen et al., 2011; Zhang et al., 2012).

Hence, taking advantage of the production of the recombinant protein (see below), we have raised an antibody against GSTF1 first to investigate its protein level in several poplar organs, i.e., leaves, petioles, stems, roots, fruits, stamens, and buds by Western Blotting (Figure 4A). A major band around 25 kDa likely corresponding to GSTF1 was detected in protein extracts from various organs, indicating that the protein is present in many tissues, though a higher protein amount was found in leaves, petioles, stems, roots and stamens. Considering that GSTF2 is a close paralog, it is possible that the detected signal represents the sum of both GSTFs. Next, considering the discrepancy observed at the transcript level as detailed above, we sought to evaluate GSTF1 protein abundance in a poplar-rust pathosystem. The model used is *P. trichocarpa* × *P. deltoides* leaves either untreated or inoculated by two *M. larici-populina* isolates, virulent, or avirulent, leading to compatible and incompatible reactions respectively

(Figure 4B). However, no significant variation in protein abundance was detected over a 7-day time-course infection which represents a whole asexual cycle from spore germination to urediniospore formation. This result suggests that GSTF1 protein levels are not affected by *M. larici-populina* infections.

POPLAR GSTF1 IS A HOMODIMERIC PROTEIN WITH GSH-CONJUGATING ACTIVITIES

In order to investigate the biochemical and structural properties of GSTF1, the mature form was expressed in *E. coli* as well as single mutated protein variants, the catalytic serine of which was replaced by a cysteine or an alanine residue. Having used a *P. tremula* × *P. tremuloides* leaf cDNA library, the amplified coding sequence, which is perfectly similar to the DN500362 EST sequence, is slightly different from the GSTF1 version found in the *P. trichocarpa* reference genome. Hence, the sequence will be referred to as PttGSTF1 in the following parts for *P. tremula* × *P. tremuloides* GSTF1. At the protein level, two very conservative changes are present, Ile33 is replaced by a Val and Lys86 by an Arg. After purification, around 30 mg of protein was obtained per liter of culture.

The purified proteins have been first analyzed by mass spectrometry. A single species was detected for each protein with molecular masses of 24192, 24511, and 24172 Da for PttGSTF1, PttGSTF1 S13C, and PttGSTF1 S13A respectively (Supplementary Table 3). Compared to theoretical masses, these values are compatible with proteins where the N-terminal methionine is cleaved, which was expected from the presence of an alanine as the second residue. A mass increment of 305 Da was specifically present in PttGSTF1 S13C, which suggested that a glutathione molecule is covalently bound to the newly introduced cysteine residue via a disulfide bridge. Accordingly, PttGSTF1 S13C is not retained on GSH Sepharose columns contrary to PttGSTF1 and PttGSTF1 S13A. Then, the oligomeric state of wild-type and mutated proteins was estimated using calibrated

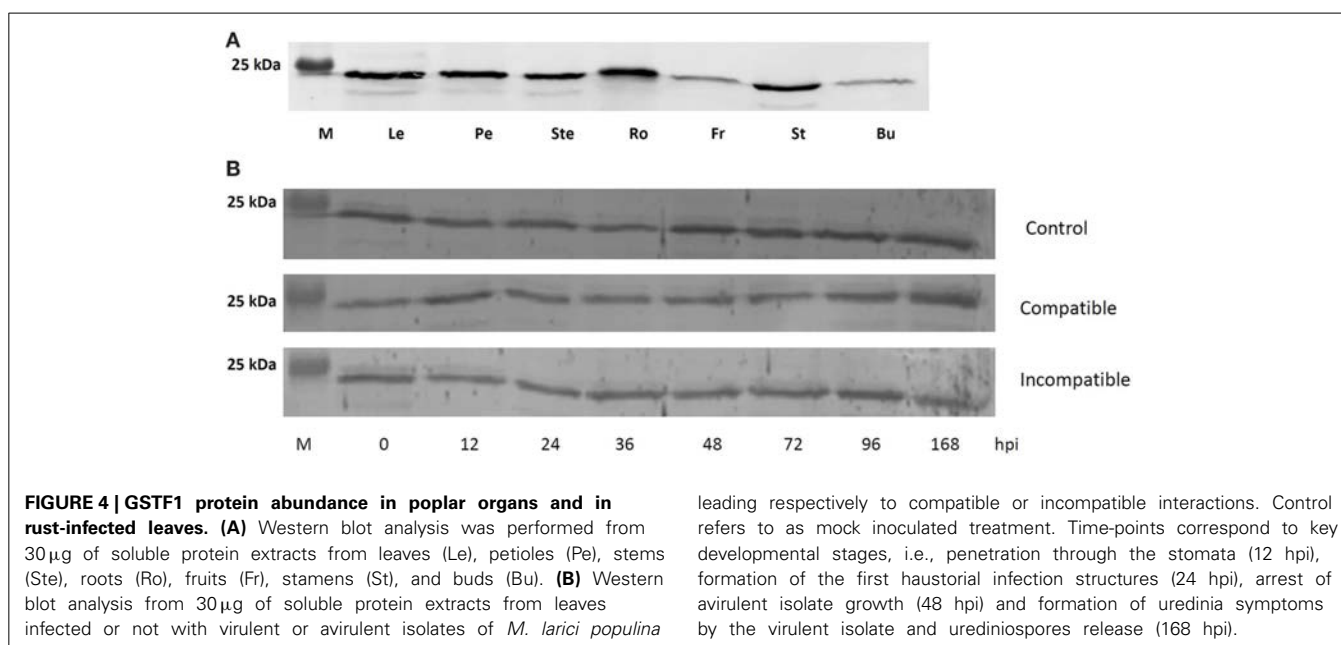


FIGURE 4 | GSTF1 protein abundance in poplar organs and in rust-infected leaves. (A) Western blot analysis was performed from 30 µg of soluble protein extracts from leaves (Le), petioles (Pe), stems (Ste), roots (Ro), fruits (Fr), stamens (St), and buds (Bu). **(B)** Western blot analysis from 30 µg of soluble protein extracts from leaves infected or not with virulent or avirulent isolates of *M. larici-populina*

leading respectively to compatible or incompatible interactions. Control refers to as mock inoculated treatment. Time-points correspond to key developmental stages, i.e., penetration through the stomata (12 hpi), formation of the first haustorial infection structures (24 hpi), arrest of avirulent isolate growth (48 hpi) and formation of uredinia symptoms by the virulent isolate and urediniospores release (168 hpi).

size exclusion chromatography. All purified proteins eluted as a single peak whose estimated mass (45–47 kDa) is consistent with a dimeric arrangement (Supplementary Table 3) as reported for example for Arabidopsis GSTF2 or maize GST-I proteins (Reinemer et al., 1996; Neufeind et al., 1997a).

Next, in order to characterize the enzymatic properties of PttGSTF1, its activity was measured toward various model substrates (CDNB, BITC, PITC, PNP-butyrate, and HNE) usually employed to measure the activities of GSTs catalyzing GSH-conjugation reactions (Table 2). An activity was detected toward all these substrates with catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) ranging from $6.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for PNP-butyrate to $3.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for HNE. The slightly better catalytic efficiency obtained for HNE compared to other substrates is due to a better affinity of PttGSTF1 for this substrate. On the other hand, the lower efficiency observed with PNP-butyrate is due to a weak turnover number (k_{cat}). The kinetic parameters for the two tested isothiocyanate derivatives were in the same range. The difference by a factor around two of the apparent K_m value indicates that variations in the aromatic groups (benzyl vs phenetyl) do not affect much substrate recognition. Comparing all substrates, the highest K_m value was for CDNB but this is compensated by a better turnover number which is around 6–20 fold better than for the other substrates tested. Using PNP-butyrate as the second substrate, an apparent affinity of GSTF1 for GSH was determined. The K_m value is $97.6 \pm 6.0 \mu\text{M}$.

Contrary to Tau GSTs, GSTFs often proved to have peroxidase activities. For this reason, we have also tested cumene hydroperoxide (CuOOH) and tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH). Whereas no activity was detected with t-BOOH, the catalytic efficiency obtained in steady-state conditions for the reduction of CuOOH into the corresponding alcohol is $3.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This is in fact quite close to the value obtained for example with a mitochondrial Prx IIF from poplar, the role of which is assumed to significantly contribute to peroxide detoxification or signaling (Gama et al., 2007).

With most substrates, the substitution of the catalytic serine into alanine (PttGSTF1 S13A variant) generally led to a completely inactive enzyme. However, a residual activity was still observed with CDNB and PNP-butyrate, the catalytic efficiency being decreased by a factor of 40 and 20 respectively compared to the results obtained with PttGSTF1. Whereas this suggested that one or several residues other than the serine contribute to the decrease of the pKa of the thiol group of GSH, the PttGSTF1 S13C variant had no or negligible activity toward all these substrates. According to the mass spectrometry results, the reason may be the formation of a covalent adduct. Hence, this prompted us to investigate whether PttGSTF1 S13C has acquired properties similar to GSTs naturally having a cysteine residue in their active site signature by testing the thioltransferase activity using DHA and HED, two substrates usually employed for characterizing Grxs and cysteine-containing GSTs. As expected, PttGSTF1 had no activity both with HED and DHA. Concerning PttGSTF1 S13C, whereas no activity has been detected with DHA, a reasonably good catalytic efficiency ($1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) was obtained with HED, essentially because of a good apparent affinity (K_m value of $33.7 \mu\text{M}$).

Besides these classical assays, we sought to examine more unusual substrates/ligands that have been isolated with orthologous GSTF members i.e., auxin/indole-3-acetic acid (IAA) or a synthetic analog, 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) (Bilang et al., 1993; Bilang and Sturm, 1995) and norharmane, indole-3-aldehyde and quercetin (Smith et al., 2003; Dixon et al., 2011). Hence, we investigated whether these compounds could constitute poplar GSTF1 substrates first by simply analyzing changes in the UV-visible spectra of each compounds as a function of time upon successive addition of GSH and PttGSTF1. However, we did not detect any significant spectral shifts (data not shown). Thinking that the glutathionylation may eventually not modify the absorption spectra of these molecules, the product of a reaction of several hours was analyzed by reverse phase-HPLC on a

Table 2 | Kinetic parameters of PttGSTF1.

	BITC	PITC	CDNB	PNP-butyrate	HNE	CuOOH	HED
K_m (μM)							
PttGSTF1	380.6 ± 43.7	148.9 ± 5.9	3065.6 ± 286.5	360.3 ± 32.2	67.1 ± 6.6	592.1 ± 51.6	ND
PttGSTF1 S13A	ND	ND	3313.9 ± 344.9	1510.9 ± 119.9	ND	ND	ND
PttGSTF1 S13C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	33.7 ± 3.5
k_{cat} (s^{-1})							
PttGSTF1	0.70 ± 0.03	0.21 ± 0.02	4.20 ± 0.18	0.23 ± 0.40	0.21 ± 0.01	1.92 ± 0.04	ND
PttGSTF1 S13A	ND	ND	0.11 ± 0.01	0.060 ± 0.002	ND	ND	ND
PttGSTF1 S13C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.040 ± 0.001
k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)							
PttGSTF1	1839.2 ± 87.2	1410.3 ± 19.0	1370.0 ± 3.6	661.9 ± 17.3	3141.6 ± 149.9	3245.7 ± 76.9	ND
PttGSTF1 S13A	ND	ND	35.4 ± 1.8	37.5 ± 1.0	ND	ND	ND
PttGSTF1 S13C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1124.7 ± 24.5

The apparent K_m values for all compounds were determined by varying substrate concentrations at a fixed saturating GSH concentration. The apparent K_m and k_{cat} values were calculated by non-linear regression using the Michaelis–Menten equation. Results are means $\pm$ S.D. ($n = 3$). ND means not detected. BITC, benzyl isothiocyanate; PITC, phenetyl isothiocyanate; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; PNP-butyrate, 4-nitrophenyl butyrate; HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; CuOOH, cumene hydroperoxide; HED, hydroxyethyl disulfide.

C18 column. However, no glutathionylated species can be separated and identified using this approach. Considering that some of these molecules may represent ligands and that the ligandin and catalytic sites in GSTs are generally overlapping at least partially, we have examined whether the addition of these molecules modulated PttGSTF1 activity. Despite using concentrations in the millimolar range, no effect was observed both using CDNB and PNP butyrate assays. We concluded that these compounds do not bind to PttGSTF1.

THE STRUCTURES OF PttGSTF1 AND PttGSTF1 S13C IN COMPLEX WITH GSH AND MES REVEAL THE RESIDUES PARTICIPATING TO SUBSTRATE BINDING

The crystallographic structures of PttGSTF1 and PttGSTF1 S13C, bound with ligands, have been obtained and refined to 1.5 and 1.8 Å resolutions (Table 1). The crystals belonged to the space group $P2_12_12_1$, and the asymmetric unit consisted of one biological dimer (residues Ala2-Ala215 in both monomers, Root Mean Square Deviation of 0.18 Å for 175 superimposed C α atoms). The analysis of the Fourier difference maps of PttGSTF1 revealed the presence of two ligands in the active site in each monomer: a glutathione molecule originating from the pre-treatment performed with an excess of GSH and a MES molecule present in the crystallization buffer. They are located respectively in the G and H sites (Figure 5A). Unless covalently bound, both ligands cannot occupy the active site simultaneously. Currently, we do not have any evidence for a GSH-conjugation reaction with MES nor data for any non-catalytic binding. Both glutathione and MES molecules were refined with complementary occupancies. In monomer A, the refined occupancies of glutathione and MES molecules were 58 and 42%, respectively. In monomer B, the corresponding refined occupancies were 71 and 29%, respectively. Therefore, PttGSTF1 structure can be described as two structures: PttGSTF1 in complex with glutathione and PttGSTF1 in complex with a MES molecule. Concerning PttGSTF1 S13C, the structure refinement confirmed that Cys13 is glutathionylated but this modification did not induce significant conformational changes in comparison to PttGSTF1 (RMSD of 0.33 Å based on alignments of 350 C α positions).

In order to understand possible differences among GSTF isoforms, a detailed comparison was performed with the three other GSTFs (AtGSTF2, maize GST-I and GST-III) whose structures are known (Reinemer et al., 1996; Neufeind et al., 1997a,b; Prade et al., 1998). The AtGSTF2 structure was solved in complex with S-hexylglutathione or with an acetamide herbicide like molecule-glutathione conjugate, ZmGST-I was in complex with lactoylglutathione or an atrazine-glutathione conjugate, and ZmGST-III was in an apoform. Interestingly, PttGSTF1 belongs to a distinct, uncharacterized GSTF subgroup (Figure 2). A PttGSTF1 monomer consists of an N-terminal domain ($\beta1\alpha1\beta2\alpha2\beta3\beta4\alpha3$) and a C-terminal domain composed of α -helices ($\alpha4\alpha5\alpha6\alpha6'\alpha7\alpha8$) (Figure 5A) as classically observed in most GST classes. As expected, structures of plant GSTFs superimposed relatively well with a mean RMSD of 0.92 Å. Prominent differences are nevertheless observed in three regions (Figure 5B). In PttGSTF1, an additional α -helix is observed in the segment between the strands $\beta2$ and $\beta3$ while others exhibit 1–3

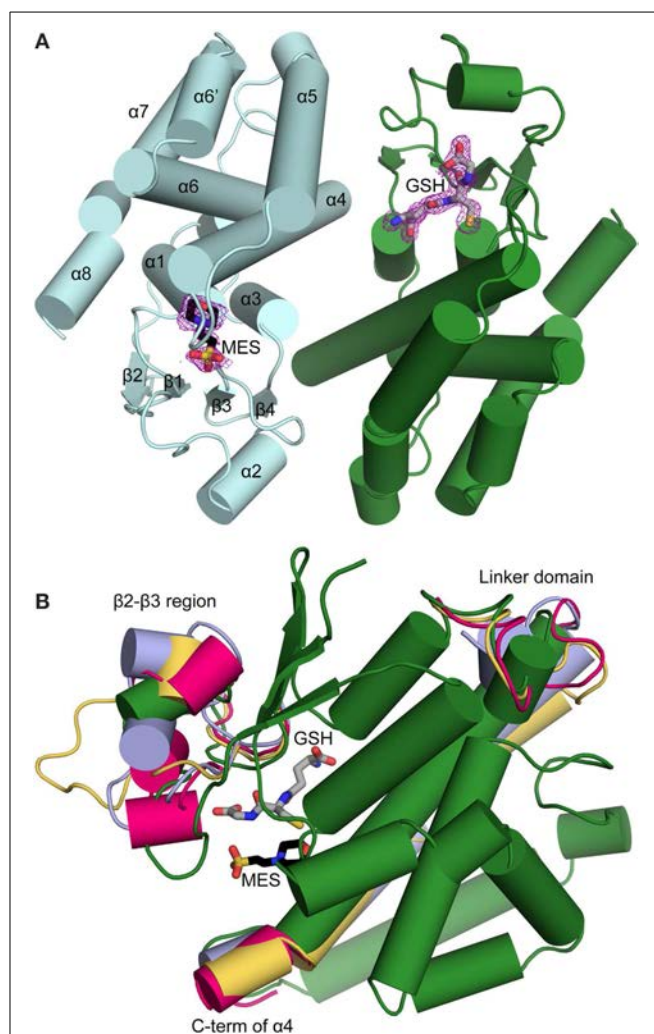


FIGURE 5 | Overall structure of PttGSTF1 and comparison with other plant GSTFs. (A) Architecture of PttGSTF1 dimer. The MES molecule (black) is located in the H site, as shown in monomer A whereas the GSH molecule (gray) bound to the G site is depicted in monomer B. Monomers A and B are colored in light cyan and dark green respectively. Secondary structures are labeled only for monomer A for clarity. The GSH and MES molecules are shown as sticks and colored according to atom type (nitrogen, blue; oxygen, red; sulfur, yellow; and carbon, gray/black). Omit map (colored in purple) of contour level of 0.8 σ is shown around each bound ligand. It was built using the Composite omit map command of the Phenix software suite. **(B)** Superimposition of monomers of PttGSTF1 (dark green), *A. thaliana* GSTF2 (pink) and *Z. mays* GST-I (blue) and GST-III (yellow). Only noticeable secondary structural differences between GSTFs are shown for clarity. The GSH (gray) and MES (black) molecules highlight the putative positions of the G and H sites respectively. GSH and MES molecules are colored according to atom type and shown as sticks.

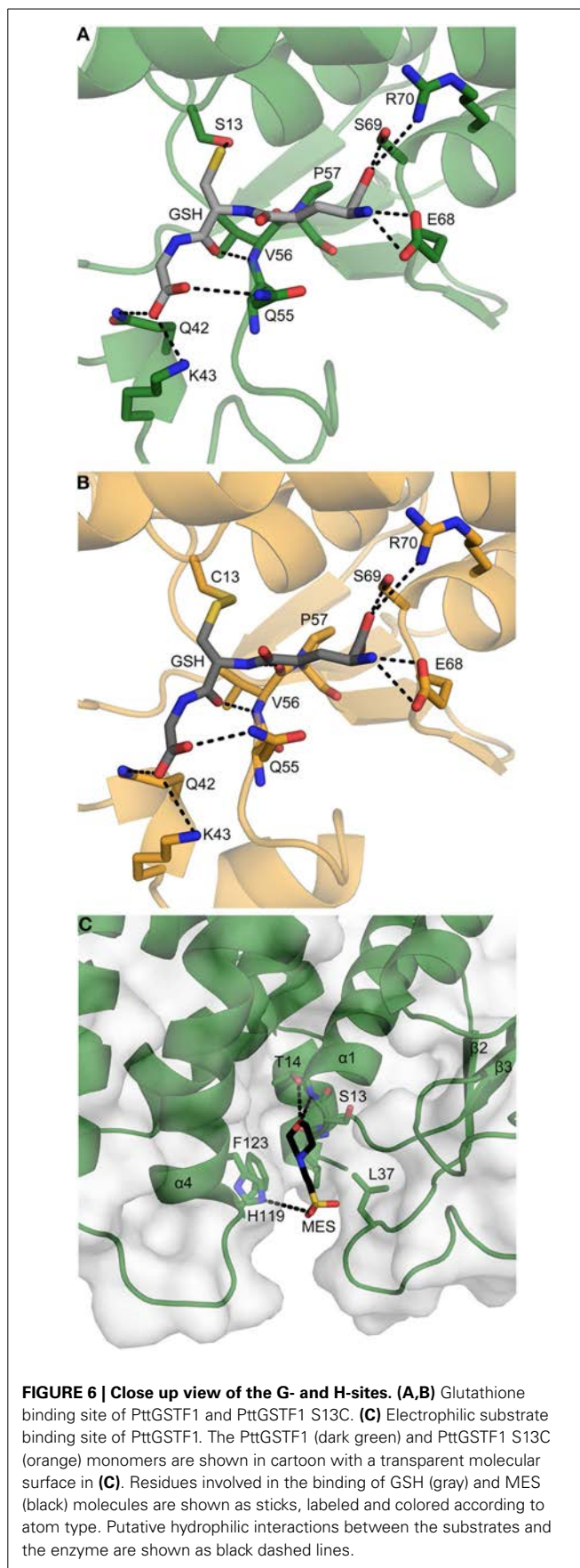
short 3_{10} -helices. This segment is involved in substrate binding and contains a conserved phenylalanine (Phe53 in PttGSTF1), which is assumed to be essential for dimerization (Prade et al., 1998). This phenylalanine represents the major inter-monomer contact, its side chain being buried in a hydrophobic pocket composed of Trp102, Thr105, Thr109, Val143, Ile146, and Tyr147 in PttGSTF1 and located between $\alpha4$ and $\alpha5$ of the other subunit.

Interestingly, among the residues involved in the dimer interface, the hydrophobic ones are those that are the most conserved in PtGSTFs (**Figure 1**). Another variation concerns the length and conformation of the linker found between $\alpha 3$ and $\alpha 4$ helices and that connects the N- and C-terminal domains. Considering the variable length of the linker, such conformational differences were expected. However, the central residue of this connecting region, Leu88 in PttGSTF1, is highly conserved and adopts a superimposable position in all plant GSTF structures. Its side chain, wedging between helices $\alpha 3$ and $\alpha 6$, connects the two domains. The last noticeable difference is likely to be a class-specific feature of PttGSTF1 in which the absence of 3 residues found in other poplar GSTFs (**Figure 1**) shortens the $\alpha 4$ helix.

In PttGSTF1, a glutathione molecule is positioned in the G site groove which is mainly populated by polar residues from the N-terminal domain (**Figure 6A**). The Glu68, Ser69, and Arg70 residues, situated in the $\beta 4$ - $\alpha 3$ loop and in $\alpha 3$, stabilize the glutamyl group of GSH through hydrogen bonds and Coulomb interactions. The NH and carbonyl groups of the cysteinyl moiety are hydrogen-bonded to the backbone amino group of Val56 that precedes the invariant cis-Pro57 found in all GSTs and in all Trx superfamily members. The carboxylate of the glycyl residue interacts with the side chains of Gln42, Lys43 and Gln55 found in the loops connecting $\beta 2$ - $\alpha 2$ and $\alpha 2$ - $\beta 3$. The thiol group of the cysteine of the GSH moiety is quasi-equidistant to the hydroxyl groups of Ser13 and Thr14 (3.2 and 3.4 Å respectively). According to mass spectrometry data, in the PttGSTF1 S13C variant, GSH is covalently bound to the modified residue (Cys13). Apart this difference, the same GSH-protein interactions are observed in both crystal structures (**Figure 6B**). With regard to the electrophilic substrate site, a MES molecule occupies the position adopted by other substrates in known GSTF structures. Hence, the H site is delimited by residues from three regions: residues 12–14 found at the end of the $\beta 1$ - $\alpha 1$ loop and in $\alpha 1$, residues 36–40 that are part of the $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop and residues 119–123 which are located in the C-terminal end of $\alpha 4$ (**Figure 6C**). The MES molecule is surrounded by the hydrophobic residues Leu12, Leu37 and Phe123. Moreover, the oxygen atom of the morpholino ring is hydrogen-bonded to the NH and OH groups of Thr14 and the sulfonic group forms a salt bridge with His119. However, the latter two residues are less conserved as compared to the three others suggesting that they might confer substrate specificities to PttGSTF1.

DISCUSSION

The existence of multigenic families is frequently explained by the functional divergence i.e., the acquirement of new or specific functions, appearing following gene duplication. With the complete sequencing of several plant genomes, it appeared that many species-specific duplication events occurred, leading to the expansion of the *GSTF* gene family. The maintenance of so many GSTF genes in the genomes (eight in poplar but up to *ca* 27 in some terrestrial plants) might be attributed for example (i) to a specific cellular/tissular expression associated to certain developmental stages or stress conditions, (ii) to specific subcellular localizations or (iii) to specific biochemical and structural characteristics. An additional layer of complexity and possible redundancy is the



existence of several tens of GSTUs in plants which have quite similar enzymatic and biochemical properties. Indeed, owing to the presence of the same conserved serine residue, GSTUs also possess glutathionylation activities toward herbicides, safeners and several other cyclic/aromatic compounds. An intriguing example illustrating the possible redundancy between GSTUs and GSTFs is the fact that petunia AN9, a GSTF gene, and maize Bz2, a GSTU gene, can complement mutants for the other gene (Alfenito et al., 1998). Some differences can however be sometimes noticed. For instance, contrary to most GSTFs, GSTUs usually do not have peroxidase activity. However, redundancy could exist with other GST classes, notably the Theta GSTs that do have such a peroxidase activity.

In this study, we provide the first elements exploring the question of the redundancy among GSTF members and functions in poplar. Focusing on the particularities among poplar GSTFs that could explain the presence of eight genes, their putative subcellular localizations were first examined from the bioinformatic analysis of primary sequences. According to the absence of clear N- or C-terminal targeting sequences, all poplar GSTFs are predicted to be cytosolic proteins. This is generally in accordance with data obtained in other organisms either from translational GFP fusion as for several GSTFs of *Physcomitrella patens* (Liu et al., 2013) or from the absence of GSTF detection in studies of organellar proteomes. A plasma membrane localization was suggested for AtGSTF2 (Murphy et al., 2002) and a dual targeting in the cytosol and chloroplast was demonstrated for AtGSTF8 owing to the presence of an alternative transcription start site (Thatcher et al., 2007). However, only a few AtGSTF8 orthologs in other plant species have a similar extension. With regard to expression profiles, all poplar GSTF genes are redundantly expressed in some organs as leaves or reproductive organs. Moreover, the transcript levels are not necessarily correlated with protein levels. For instance, we did not detect GSTF1 transcripts in roots whereas quite important protein amounts were detected by western blot. It certainly illustrates the variations inherent to the plant developmental stages or to the fluctuations of environmental constraints as we have harvested our samples from a naturally growing tree and at different periods. Considering that many GSTFs could have similar cellular and subcellular expression territories, the difference should come from specific biochemical and/or structural properties. This parameter has been examined by producing PttGSTF1 as a recombinant protein and assessing its activity toward model substrates representing various types of biochemical activities as well as by solving the 3D structure of the first GSTF representative from a tree. Indeed, structures for only three GSTFs have been solved in the late 90's and nothing since that time.

As other GSTF members bearing a conserved serine in the active site motif, enzymatic analysis showed that GSTF1 possesses glutathione-conjugating activity toward structurally diverse substrates and glutathione peroxidase activity. The kinetic parameters of GSTF1 activity toward the model substrate CDNB (k_{cat}/K_m of $1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) are within the range of reported values for some GSTFs as *P. patens* GSTF1 (k_{cat}/K_m of $1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Liu et al., 2013) although important variations can be sometimes detected. *Triticum aestivum* GSTF1 exhibits a 50 fold higher

catalytic efficiency (k_{cat}/K_m of $7.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Cummins et al., 2003). While CDNB is an artificial substrate that may somehow mimic the structure of some herbicides and that is usually modified by all GSTFs, the other substrates used may be more physiologically relevant. BITC and PITC are representatives of a family of natural compounds found in Brassicaceae and produced by the enzymatic degradation of glucosinolates. Surprisingly, whereas glucosinolates are found in Arabidopsis, only a few Arabidopsis GSTF members among the 13 isoforms are able to catalyze conjugation reactions on BITC (Wagner et al., 2002; Nutricati et al., 2006; Dixon et al., 2009). The quite important turnover number obtained for the GSH-conjugation reaction of BITC by PttGSTF1 (k_{cat} of 0.70 s^{-1}) indicates that poplar GSTF1 may have the particular ability to recognize related molecules. As a matter of comparison, higher turnover numbers, around 25 s^{-1} , have been reported for *Homo sapiens* GST M1-1 or P1-1 both using BITC and PITC (Kolm et al., 1995). CuOOH is used as a molecule representative of bulky peroxides such as peroxidized lipids whereas HNE is a toxic aldehyde formed as a major end product of lipid peroxidation (Esterbauer et al., 1991). Both types of molecules have a dual function, being deleterious by promoting DNA damages or membrane protein inactivation, but at the same time, they represent signaling molecules. Whereas peroxide activity is systematically tested for GSTFs, the GSH-conjugation of HNE has been rarely evaluated. One example is the demonstration that a *Sorghum bicolor* B1/B2 GSTF heterodimer purified from shoots of fluxofenim-treated plants exhibits a catalytic efficiency about 15 fold higher (calculated k_{cat}/K_m for this protein is around $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) than for PttGSTF1 (k_{cat}/K_m of $1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Gronwald and Plaisance, 1998). With regard to peroxides, most GSTFs tested so far, whatever their origin, exhibit a glutathione peroxidase activity. Compared to other characterized GSTFs, poplar GSTF1 possesses quite elevated peroxidase activity toward cumene hydroperoxide with a turnover number of 1.92 s^{-1} (Dixon et al., 2009). It is for instance in the same range as those reported for *Lolium rigidum* and *Alopecurus myosuroides* GSTF1 which are considered as highly active peroxidases (k_{cat} of 2.64 and 1.3 s^{-1} respectively) (Cummins et al., 2013). From a physiological perspective, it is worth noting that pathogen attacks are often accompanied by an oxidative stress that triggers, among other symptoms, lipid peroxidation. Also, important amounts of HNE are accumulated in *Phaseolus vulgaris* upon fungal infection by *Botrytis cinerea* (Muckenschnabel et al., 2002). With the known induction of GSTF genes by defense hormones or biotic stresses (Wagner et al., 2002), their known involvement in the synthesis of defense compounds as camalexin (Su et al., 2011), the peroxidase and GSH-conjugating HNE activities, it is conceivable that GSTF1 is involved in oxidative stress tolerance and/or oxidative signaling occurring in particular during pathogen or insect attacks. In fact, whereas GSTF1 expression is induced in poplar attacked by the tent caterpillar *Malacosoma disstria* (Ralph et al., 2006) contrasting results have been obtained for GSTF1 in the case of rust infected poplars. Indeed GSTF1 gene was found to be up-regulated at six dpi in a former study investigating gene expression in *Populus trichocarpa* $\times$ *P. deltoides* leaves infected by *Melampsora medusae* which represent a compatible interaction (Miranda et al., 2007).

On the other hand, no regulation was detected when *Populus nigra* × *P. maximowiczii* leaves are infected by *M. medusae* or *M. larici-populina* (Azaiez et al., 2009) or when *P. trichocarpa* × *P. deltoides* leaves are infected by *M. larici-populina* either by a virulent (compatible) or an avirulent (incompatible) isolate (Rinaldi et al., 2007). According to the transcript measurements, no variation of GSTF1 protein level has been detected in *P. trichocarpa* × *P. deltoides* leaves during both compatible and incompatible reactions with *M. larici populina*. Here, the observed differences might simply be explained by differences in the poplar cultivars, rust isolates and time-points used in these independent studies, which altogether generate some specificity in these interactions. It would be informative to systematically analyze transcript and protein variations for all poplar GSTFs in different biotic interactions as done previously for example for the Arabidopsis or wheat GSTF families (Wagner et al., 2002; Cummins et al., 2003). To summarize this part, the biochemical and expression analyses demonstrated that, through its peroxidase and its GSH-conjugating activities, GSTF1 may have multiple roles notably related to xenobiotic detoxification or to oxidative stress tolerance both under biotic and abiotic constraints.

Contrary to other GSTFs, we have not observed an interaction or an activity with auxin and other heterocyclic compounds such as norharmane, indole-3-aldehyde and quercetin that were previously found to interact with other GSTFs and AtGSTF2 in particular (Bilang and Sturm, 1995; Smith et al., 2003; Dixon et al., 2011). This may indicate that PttGSTF1 has no ligandin function. In fact, several GSTFs for which ligandin function has been demonstrated, such as AN8 or Bz2, do not have the catalytic serine but an alanine instead in a AAXP motif. It does not mean however, that these GSTFs do not have catalytic functions. In fact, when the catalytic serine of PttGSTF1 was replaced by an alanine, the glutathionylation activity is not totally abolished as we would expect and a weak activity toward certain substrates was still measurable. This suggests that the catalytic serine is important but not mandatory for GSH-conjugating reactions and that residues other than the catalytic serine could be involved in glutathione activation. In support of this view, it has been reported that human GSTO1-1, a Cys-GST, loses deglutathionylation activity and acquires glutathionylation activity when the catalytic cysteine is replaced by an alanine (Whitbread et al., 2005). While Ser13 likely corresponds to the catalytic residue found in most GSTFs and is the primary candidate for GSH activation, the hydroxyl group of the adjacent Thr14 is found approximately at the same distance in the PttGSTF1 structure. Hence, it is tempting to conclude that it might substitute to Ser13, at least in its absence. It is worth noting that with the exception of some GSTF clades, the members of which have a proline, the catalytic serine is often followed by another Ser or Thr in most members of other clades (Figure 2). Interestingly, neither the serine nor the threonine is conserved in the clade containing poplar GSTF8 which harbors aliphatic residues at these positions (AACP signature). In this specific case, we could speculate that the cysteine found after the threonine position acts as the catalytic residue. Although this will have to be confirmed experimentally, it is interesting to note that poplar GSTF3 and

F7 and their close orthologs also have a cysteine at this position, and that fungal Ure2p-like enzymes have an asparagine that was recently assumed to be important for catalysis (Thuillier et al., 2013). Overall, this suggests that all residues forming the active site signature and present around the N-terminal end of $\alpha 1$ could substitute to each other. Another proof of this assumption is that the PttGSTF1 S13C mutant lost its glutathione peroxidase and glutathionylating activity but acquired the capacity to perform deglutathionylation reaction toward HED, an activity typical of Cys-GSTs. Although the detected activity is weaker than the one obtained with naturally-existing Cys-GSTs (Lallement et al., 2014a), it shows that changing the nature of the catalytic residue is sufficient to determine the type of GST activity. Accordingly, when the catalytic cysteine of poplar Lambda GSTs is mutated into a serine, a shift from the original deglutathionylation to glutathionylation activity was observed (Lallement et al., 2014b).

Complementary to the biochemical and enzymatic analyses, the structural analysis should help understanding why GSTFs accept such diverse substrates but at the same time what are the fine differences that would generate substrate specificity. A comparison of poplar PttGSTF1 with AtGSTF2 structure does not point to dramatic structural changes. In fact, the glutathione binding site is in general not very different within a GST class but also among diverse GST classes. This is what we observed by superimposing GSTF structures. Rather, structural differences if any should come from variations in the H-site. However, owing to the lack of structures of GST in complex with their ligands, this H-site is often not very well defined. In the PttGSTF1 structure, the MES molecule, which likely mimics an H-site substrate (although it does not seem to be catalytically glutathionylated), is stabilized by five residues, Leu12, Thr14, Leu37, and His119 and Phe123. The Thr14 which is present in all poplar GSTFs except GSTF8, is in fact not found in other proteins whose structures are known, AtGSTF2 (SIAT signature), ZmGST-I (SWNL signature), and ZmGST-III (SPNV signature). Similarly, the His119 position is variable and it is occupied by an aromatic residue (Phe or Trp) in other poplar GSTFs as well as in AtGSTF2, ZmGST-I and ZmGST-III. Hence it is possible that these residues contribute to the recognition of specific substrates by PttGSTF1. In particular, the presence of His119 may be responsible for the binding of the MES molecule. On the contrary, the residues found at positions equivalent to Leu12, Leu37, and Phe123 in PttGSTF1 are also hydrophobic in most plant GSTFs and they are involved in the stabilization of the substrate in known structures of plant GSTFs in complex with herbicides. Thus, they seem to be critical for the electrophilic substrate recognition and they could constitute the core residues required for the general recognition of substrates. Supporting this view, it was shown that the Phe123 to Ile substitution in AtGSTF2 altered its ligand affinity and specificity (Dixon et al., 2011). Leu37 is found between $\beta 2$ and $\beta 3$, a region which is not well superimposable from one structure to another. For instance, five residues from this region are not visible in the electron density of the crystal structure of apo ZmGSTIII (Neuefeind et al., 1997b). A Phe35 modification in ZmGST-I (the residue equivalent to Leu37 in PttGSTF1) affects the enzyme affinity for its ligand (Axarli et al., 2004). Overall, this indicates that the

$\beta 2$ - $\beta 3$ region could be the protein area used by GSTFs to accommodate such a large spectrum of ligands/substrates. In GSTUs, the end of $\alpha 4$ helix and the C-terminal part are other regions that contribute to the correct positioning of the substrate in the H-site (Axarli et al., 2009). Similarly, the residues found at the end of $\alpha 4$ helix are also used by Lambda and Omega GSTs for substrate recognition which also involves the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop and a C-terminal helix ($\alpha 9$) which is specific to these two classes (Lallement et al., 2014b). In contrast, in GHR/Xi GSTs, proteins specialized in the reduction of glutathionylated quinones, no ample conformational change occurs upon substrate binding (Lallement et al., 2014c).

To conclude on these biochemical and structural analyses, it is conceivable that most GSTFs display a common set of enzymatic activities on typical substrates that is linked to the conservation of core residues. The persistence of closely related genes in single species may be explained by subtle sequence changes that confer the ability to the enzymes to accommodate specific substrates and thus to acquire specific functions. Hence, to address this question of the enzyme divergence and substrate specificity, isolating and identifying physiological GSTF substrates should become a priority as well as accumulating more 3D structures of GSTFs from poplar and other plants, alone or more importantly in complex with their physiological substrates.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Henri Pégeot, Cha San Koh, Benjamin Petre, and Sandrine Mathiot performed the experiments under the supervision of Sébastien Duplessis, Arnaud Hecker, Claude Didierjean, and Nicolas Rouhier. All authors contributed to the writing of the manuscript, have read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the “Investissements d’Avenir” program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). The PhD grant of Henri Pégeot is funded by ANR-11-LABX-0002-01 and the région Lorraine. Access to the X-ray diffraction facilities of the Université de Lorraine was appreciated. We are grateful to the staff members of X11 beamline of the EMBL/DESY Synchrotron (Hamburg, Germany) and of BM30A beamline at ESRF (Grenoble, France).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fpls.2014.00712/abstract>

REFERENCES

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 213–221. doi: 10.1107/S0907444909052925
- Alfenito, M. R., Souer, E., Goodman, C. D., Buell, R., Mol, J., Koes, R., et al. (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell* 10, 1135–1149. doi: 10.1105/tpc.10.7.1135
- Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 2–18. doi: 10.1021/tx960072x
- Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A. C., and Labrou, N. E. (2009). Crystallographic and functional characterization of the fluorodifen-inducible glutathione transferase from *Glycine max* reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site. *J. Mol. Biol.* 385, 984–1002. doi: 10.1016/j.jmb.2008.10.084
- Axarli, I. A., Rigden, D. J., and Labrou, N. E. (2004). Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I. *Biochem. J.* 382, 885–893. doi: 10.1042/BJ20040298
- Azaiez, A., Boyle, B., Levee, V., and Seguin, A. (2009). Transcriptome profiling in hybrid poplar following interactions with *Melampsora rust* fungi. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 190–200. doi: 10.1094/MPMI-22-2-0190
- Bilang, J., Macdonald, H., King, P. J., and Sturm, A. (1993). A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione S-transferase. *Plant Physiol.* 102, 29–34. doi: 10.1104/pp.102.1.29
- Bilang, J., and Sturm, A. (1995). Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 109, 253–260. doi: 10.1104/pp.109.1.253
- Chen, F., Zhang, S., Jiang, H., Ma, W., Korpelainen, H., and Li, C. (2011). Comparative proteomics analysis of salt response reveals sex-related photosynthetic inhibition by salinity in *Populus cathayana* cuttings. *J. Proteome Res.* 10, 3944–3958. doi: 10.1021/pr200535r
- Cohen, D., Bogeat-Triboulot, M. B., Tisserant, E., Balzergue, S., Martin-Magniette, M. L., Lelandais, G., et al. (2010). Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. *BMC Genomics* 11:630. doi: 10.1186/1471-2164-11-630
- Couturier, J., Stroher, E., Albetel, A. N., Roret, T., Muthuramalingam, M., Tarrago, L., et al. (2011). Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin C5 as a model to explore molecular determinants for iron-sulfur cluster binding into glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* 286, 27515–27527. doi: 10.1074/jbc.M111.228726
- Cummins, I., Bryant, D. N., and Edwards, R. (2009). Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Plant Biotechnol. J.* 7, 807–820. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00445.x
- Cummins, I., Cole, D. J., and Edwards, R. (1999). A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J.* 18, 285–292. doi: 10.1046/j.1365-3113.1999.00452.x
- Cummins, I., O’Hagan, D., Jablonkai, I., Cole, D. J., Hehn, A., Werck-Reichhart, D., et al. (2003). Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat. *Plant Mol. Biol.* 52, 591–603. doi: 10.1023/A:1024858218804
- Cummins, I., Wortley, D. J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C. R., Straker, H. E., et al. (2013). Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 5812–5817. doi: 10.1073/pnas.1221179110
- Deridder, B. P., Dixon, D. P., Beussman, D. J., Edwards, R., and Goldsbrough, P. B. (2002). Induction of glutathione S-transferases in Arabidopsis by herbicide safeners. *Plant Physiol.* 130, 1497–1505. doi: 10.1104/pp.010066
- Dixon, D. P., Hawkins, T., Hussey, P. J., and Edwards, R. (2009). Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *J. Exp. Bot.* 60, 1207–1218. doi: 10.1093/jxb/ern365
- Dixon, D. P., Sellars, J. D., and Edwards, R. (2011). The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. *Biochem. J.* 438, 63–70. doi: 10.1042/BJ20101884
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501. doi: 10.1107/S0907444910007493
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81–128. doi: 10.1016/0891-5849(91)90192-6
- Gama, F., Keech, O., Eymery, F., Finkemeier, I., Gelhaye, E., Gardeström, P., et al. (2007). The mitochondrial type II peroxiredoxin from poplar. *Physiol. Plant.* 129, 196–206. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00785.x
- Gonneau, M., Pagant, S., Brun, F., and Laloue, M. (2001). Photoaffinity labelling with the cytokinin agonist azido-PPU of a 34 kDa peptide of the intracellular pathogenesis-related protein family in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol. Biol.* 46, 539–548. doi: 10.1023/A:1010693213437

- Gronwald, J. W., and Plaisance, K. L. (1998). Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from sorghum. *Plant Physiol.* 117, 877–892. doi: 10.1104/pp.117.3.877
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
- Kabsch, W. (2010). Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132. doi: 10.1107/S0907444909047337
- Kieffer, P., Schroder, P., Dommès, J., Hoffmann, L., Renaut, J., and Hausman, J. F. (2009). Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *J. Proteomics* 72, 379–396. doi: 10.1016/j.jprot.2009.01.014
- Kitamura, S., Shikazono, N., and Tanaka, A. (2004). TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant J.* 37, 104–114. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01943.x
- Kolm, R. H., Danielson, U. H., Zhang, Y., Talalay, P., and Mannervik, B. (1995). Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies. *Biochem. J.* 311(Pt 2), 453–459.
- Lallement, P. A., Brouwer, B., Keech, O., Hecker, A., and Rouhier, N. (2014a). The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. *Front. Pharmacol.* 5:192. doi: 10.3389/fphar.2014.00192
- Lallement, P. A., Meux, E., Gualberto, J. M., Dumarcay, S., Favier, F., Didierjean, C., et al. (2014c). Glutathionyl-hydroquinone reductases from poplar are plastidial proteins that deglutathionylate both reduced and oxidized quinones. *FEBS Lett.* doi: 10.1016/j.febslet.2014.11.021. [Epub ahead of print].
- Lallement, P. A., Meux, E., Gualberto, J. M., Prosper, P., Didierjean, C., Saul, F., et al. (2014b). Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. *Biochem. J.* 462, 39–52. doi: 10.1042/BJ20140390
- Lan, T., Yang, Z. L., Yang, X., Liu, Y. J., Wang, X. R., and Zeng, Q. Y. (2009). Extensive functional diversification of the Populus glutathione S-transferase supergene family. *Plant Cell* 21, 3749–3766. doi: 10.1105/tpc.109.070219
- Lieberherr, D., Wagner, U., Dubuis, P. H., Metraux, J. P., and Mauch, F. (2003). The rapid induction of glutathione S-transferases AtGSTF2 and AtGSTF6 by avirulent *Pseudomonas syringae* is the result of combined salicylic acid and ethylene signaling. *Plant Cell Physiol.* 44, 750–757. doi: 10.1093/pcp/pcg093
- Liu, Y. J., Han, X. M., Ren, L. L., Yang, H. L., and Zeng, Q. Y. (2013). Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants. *Plant Physiol.* 161, 773–786. doi: 10.1104/pp.112.205815
- Miranda, M., Ralph, S. G., Mellway, R., White, R., Heath, M. C., Bohlmann, J., et al. (2007). The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *P. deltoides*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 816–831. doi: 10.1094/MPMI-20-7-0816
- Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., et al. (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microb. Biotechnol.* 6, 248–263. doi: 10.1111/1751-7915.12015
- Muckenschnabel, I., Goodman, B. A., Williamson, B., Lyon, G. D., and Deighton, N. (2002). Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *J. Exp. Bot.* 53, 207–214. doi: 10.1093/jexbot/53.367.207
- Mueller, L. A., Goodman, C. D., Silady, R. A., and Walbot, V. (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123, 1561–1570. doi: 10.1104/pp.123.4.1561
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M. J., et al. (2008). General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 768–785. doi: 10.1105/tpc.107.054809
- Murphy, A. S., Hoogner, K. R., Peer, W. A., and Taiz, L. (2002). Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128, 935–950. doi: 10.1104/pp.010519
- Neuefeind, T., Huber, R., Dasenbrock, H., Prade, L., and Bieseler, B. (1997a). Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. *J. Mol. Biol.* 274, 446–453. doi: 10.1006/jmbi.1997.1402
- Neuefeind, T., Huber, R., Reinemer, P., Knablen, J., Prade, L., Mann, K., et al. (1997b). Cloning, sequencing, crystallization and X-ray structure of glutathione S-transferase-III from *Zea mays* var. mutin: a leading enzyme in detoxification of maize herbicides. *J. Mol. Biol.* 274, 577–587. doi: 10.1006/jmbi.1997.1401
- Nutricati, E., Miceli, A., Blando, F., and De Bellis, L. (2006). Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases. *Plant Cell Rep.* 25, 997–1005. doi: 10.1007/s00299-006-0146-1
- Otwiniowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307–326. doi: 10.1016/S0076-6879(97)76066-X
- Prade, L., Huber, R., and Bieseler, B. (1998). Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase - explanations for the selectivity of the enzyme in plants. *Structure* 6, 1445–1452. doi: 10.1016/S0969-2126(98)00143-9
- Ralph, S., Oddy, C., Cooper, D., Yueh, H., Jancsik, S., Kolosova, N., et al. (2006). Genomics of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*) interacting with forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*): normalized and full-length cDNA libraries, expressed sequence tags, and a cDNA microarray for the study of insect-induced defences in poplar. *Mol. Ecol.* 15, 1275–1297. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02824.x
- Reinemer, P., Prade, L., Hof, P., Neuefeind, T., Huber, R., Zettl, R., et al. (1996). Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J. Mol. Biol.* 255, 289–309. doi: 10.1006/jmbi.1996.0024
- Rinaldi, C., Kohler, A., Frey, P., Duchaussoy, F., Ningre, N., Couloux, A., et al. (2007). Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiol.* 144, 347–366. doi: 10.1104/pp.106.094987
- Sappl, P. G., Carroll, A. J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Harvey Millar, A., et al. (2009). The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J.* 58, 53–68. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03761.x
- Sappl, P. G., Onate-Sanchez, L., Singh, K. B., and Millar, A. H. (2004). Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Mol. Biol.* 54, 205–219. doi: 10.1023/B:PLAN.0000028786.57439.b3
- Smith, A. P., Deridder, B. P., Guo, W. J., Seeley, E. H., Regnier, F. E., and Goldsbrough, P. B. (2004). Proteomic analysis of *Arabidopsis* glutathione S-transferases from benoxacor- and copper-treated seedlings. *J. Biol. Chem.* 279, 26098–26104. doi: 10.1074/jbc.M402807200
- Smith, A. P., Nourizadeh, S. D., Peer, W. A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A. S., et al. (2003). *Arabidopsis* AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant J.* 36, 433–442. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01890.x
- Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., et al. (2011). Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 364–380. doi: 10.1105/tpc.110.079145
- Thatcher, L. F., Carrie, C., Andersson, C. R., Sivasithamparam, K., Whelan, J., and Singh, K. B. (2007). Differential gene expression and subcellular targeting of *Arabidopsis* glutathione S-transferase F8 is achieved through alternative transcription start sites. *J. Biol. Chem.* 282, 28915–28928. doi: 10.1074/jbc.M702207200
- Thuillier, A., Roret, T., Favier, F., Gelhaye, E., Jacquot, J. P., Didierjean, C., et al. (2013). Atypical features of a Ure2p glutathione transferase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 587, 2125–2130. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.031
- Vagin, A., and Teplyakov, A. (2010). Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 22–25. doi: 10.1107/S0907444909042589
- Vieira Dos Santos, C., Cuine, S., Rouhier, N., and Rey, P. (2005). The *Arabidopsis* plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins. Sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A, and induction by photooxidative stress. *Plant Physiol.* 138, 909–922. doi: 10.1104/pp.105.062430
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D. P., and Mauch, F. (2002). Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* 49, 515–532. doi: 10.1023/A:1015557300450

- Whitbread, A. K., Masoumi, A., Tetlow, N., Schmuck, E., Coggan, M., and Board, P. G. (2005). Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Meth. Enzymol.* 401, 78–99. doi: 10.1016/S0076-6879(05)01005-0
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., et al. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 235–242. doi: 10.1107/S0907444910045749
- Zhang, S., Feng, L., Jiang, H., Ma, W., Korpelainen, H., and Li, C. (2012). Biochemical and proteomic analyses reveal that *Populus cathayana* males and females have different metabolic activities under chilling stress. *J. Proteome Res.* 11, 5815–5826. doi: 10.1021/pr3005953

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

Received: 07 October 2014; accepted: 26 November 2014; published online: 23 December 2014.

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

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

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

Supplementary Material of the paper

The poplar phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1

Henri Pégeot^{1,2}, Chasan Koh^{3,4}, Benjamin Petre^{1,2,¥}, Sandrine Mathiot^{3,4}, Sébastien Duplessis^{1,2}, Arnaud Hecker^{1,2}, Claude Didierjean^{3,4}, Nicolas Rouhier^{1,2*}

Supplementary Table 1. Protein sequences used and corresponding accession numbers used to built unrooted phylogenetic tree of GSTFs from terrestrial plants can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fpls.2014.00712/abstract>

Supplementary Table 2. Primers used in this study for RT-PCR, cloning and site-directed mutagenesis experiments

Name	Sequence
RT-PCR experiments	
<i>Pt-GSTF1 (Potri.002G015100)</i>	
Pt-GSTF1-RT-For	5'-CCCCCATGGCTACTCCGGTGACTATT-3'
Pt-GSTF1-RT-Rev	5'-ATTGCTTTTGATAAGATG-3'
<i>Pt-GSTF2 (Potri.002G015200)</i>	
Pt-GSTF2-RT-For	5'-CCCCCATGGCAACTCCAGTGAAGGTG-3'
Pt-GSTF2-RT-Rev	5'-TGATGCCCTTTCTAATGGG-3'
<i>Pt-GSTF3 (Potri.014G132200)</i>	
PtGSTF3-RT-For	5'-CTCTCGTGTCTGACTTGTCTG-3'
PtGSTF3-RT-Rev	5'-TGCTATCGCAGGGTGAATTGT-3'
<i>Pt-GSTF4 (Potri.T035400)</i>	
PtGSTF4-RT-For	5'-TAAAGTCCACGGAAGCACCC-3'
PtGSTF4-RT-Rev	5'-CTCCATCCACACTGATAA-3'
<i>Pt-GSTF5 (Potri.T035300)</i>	
PtGSTF5-RT-For	5'-GAAACTCCATGGAAGCGTTT-3'
PtGSTF5/6-RT-Rev	5'-TTCTTGCCATACCAAAT-3'
<i>Pt-GSTF6 (Potri.T035100)</i>	
PtGSTF6-RT-For	5'-GAAACTCCATGGAACCCCTA-3'
PtGSTF5/6-RT-Rev	5'-TTCTTGCCATACCAAAT-3'
<i>Pt-GSTF7 (Potri.017G138800)</i>	
PtGSTF7-RT-For	5'-CTCTCGCGTGCTGACATGC-3'
PtGSTF7-RT-Rev	5'-TGCTATCGCAGGGTTATATCGG-3'
<i>Pt-GSTF8 (Potri.T035000)</i>	
PtGSTF8-RT-For	5'-TGCCCACAAAGGGTCATGGCT-3'
PtGSTF8-RT-Rev	5'-GAACACCAGATCATTGAAGTTG-3'
<i>Pt-UBQ (Potri.015G013600)</i>	
Pt-UBQ-RT-For	3'-GCAGGGAAACAGTGAGGAAGG-3'
Pt-UBQ-RT-Rev	5'-GCTCTGGACTCACGAGGACAG-3'
Cloning in pET-3d expression vector	
Pt-GSTF1- <u>NcoI</u> -For	5'-CCCCCATGGCTACTCCGGTGACTATT-3'
Pt-GSTF1- <u>BamHI</u> -Rev	5'-CCCCGATCCTCAAGCATTTTCTCAT-3'
Mutagenesis	
Pt-GSTF1-S13C-For	5'-TACGGGCCACCATTTGTGCACGGCAGTGTGAGA-3'
Pt-GSTF1-S13C-Rev	5'-TCTCGACACTGCCGTGCAATGGTGGCCCGTA-3'
Pt-GSTF1-S13A-For	5'-TACGGGCCACCATTTGCCACGGCAGTGTGAGA-3'
Pt-GSTF1-S13A-Rev	5'-TCTCGACACTGCCGTGCCAATGGTGGCCCGTA-3'

Supplementary Table 3. Molecular mass analysis of native PtGSTF1, PtGSTF1 S13A and S13C by mass spectrometry and analytical gel filtration

Protein	Theoretical mass (Da)	Native (Da)	Mass determined by FPLC (Da)
Pt-GSTF1	24320.7	24192 (- Met)	47600 (Dimer)
Pt-GSTF1 S13C	24336.8	24511 (- Met + GSH)	45000 (Dimer)
Pt-GSTF1 S13A	24304.7	24172 (- Met)	47200 (Dimer)

6. Article 2 : The structural and sequence permissiveness in the glutathione transferase Phi class: natural combination of catalytic residues confers dual biochemical functions

Henri Pégeot, Sandrine Mathiot, Thomas Perrot, Frédéric Gense, Arnaud Hecker, Claude Didierjean, Nicolas Rouhier

The structural and sequence plasticity in the glutathione transferase Phi class: natural combination of catalytic residues confers dual biochemical functions

Henri Pégeot^{1,2}, Sandrine Mathiot^{3,4}, Thomas Perrot^{1,2}, Frédéric Gense^{3,4}, Arnaud Hecker^{1,2}, Claude Didierjean^{3,4}, Nicolas Rouhier^{1,2*}

¹Université de Lorraine, UMR 1136 Interactions Arbres/Microorganismes, Faculté des Sciences et Technologies, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

²INRA, UMR 1136 Interactions Arbres/Microorganismes, Centre INRA Nancy Lorraine, 54280 Champenoux, France

³Université de Lorraine, CRM2, Equipe BioMod, UMR 7036, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁴CNRS, CRM2, Equipe BioMod, UMR 7036, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

* To whom correspondence should be addressed: Université de Lorraine, Interactions Arbres/Microorganismes, UMR1136, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France – Email: nicolas.rouhier@univ-lorraine.fr

Abstract

Plant glutathione transferases (GSTs) constitute a monophyletic gene family that can be divided into fourteen classes. Among them, the Phi class (GSTF) is composed of a large number of genes that are often highly induced in response to environmental constraints due to their ability to detoxify xenobiotics such as herbicides, their peroxidase activity and their involvement in the biosynthesis or transport of secondary metabolites. However, the functions of GSTFs from many plants including *Populus trichocarpa* are unknown. Here, following the previous characterization of GSTF1, we have performed a comparative analysis of the seven other GSTFs found in poplar, by systematically measuring the biochemical and enzymatic properties of the corresponding recombinant proteins and of some protein variants mutated for active site residues and by determining the tridimensional structures of GSTF representatives. Owing to the presence of a cysteine with a pKa value around 5 in their active site signature, GSTF3, F7 and F8 display deglutathionylation activity in addition to the usual glutathionylation, and glutathione peroxidase activities. From GSTF7 structural analysis, it appears that these dual but opposite biochemical properties originate from the existence a certain flexibility in the β 1- α 1 loop which allows positioning all active site residues at proximity of the glutathione molecule which itself remains invariably unchanged. These results first offered a ground to discuss functional redundancy within the GSTF class. Moreover, they illustrate the fact that the plasticity in residues of the active site motif generate functional diversity and that it occurred in the GSTF class as in several other GST classes during evolution.

Introduction

Glutathione transferases (GSTs) are multifunctional enzymes that usually promote the nucleophilic attack of the cysteine thiol group of the tripeptide glutathione (GSH) on molecules having electrophilic carbon, sulfur or oxygen atoms [1, 2]. Their presence in most eukaryotes, prokaryotes and archaea reflects their widespread nature and very likely important functions [3-5]. In plants, GSTs have been first studied in cultivated crops owing to their ability to detoxify herbicides and it was established later on that these enzymes are major actors of the plant xenome which can be defined as ‘the biosystem responsible for the detection, transport and detoxification of xenobiotics’ [6]. The response to xenobiotic exposure involves large-scale transcriptional gene reprogramming especially for genes coding for proteins that operate in a so-called three-phase detoxification system. During phase I, cytochrome P450 monooxygenases generate reactive centers on the target molecules. These molecules are subsequently conjugated by various phase II enzymes performing reactions such as glutathionylation, acylation, acetylation, methylation, hydration or glucuronidation. GSTs represent one of these enzyme families. Finally, the conjugated xenobiotic is eliminated from the cytosol by ABC (ATP binding cassette) transporters being sequestered into the vacuole or excreted in the cell wall [6].

It is worth noting that GSTs form a large number of classes, some of them being specific to some kingdoms or species genera [4, 5]. A recent phylogenetic analysis achieved in photosynthetic organisms indicated that they can be split into 14 classes, namely Phi (F), Tau (U), Theta (T), Zeta (Z), Lambda (L), Hemerythrin (H), Iota (I), Ure2p, glutathionyl-hydroquinone reductase (GHR), elongation factor 1B Gamma (EF1B γ), dehydroascorbate reductase (DHAR), tetra-chlorohydroquinone dehalogenase (TCHQD), metaxin and microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES-2) [7]. Based on the catalytic residue present in the active site signature, these plant GST classes can be further distinguished as serine-containing GSTs (Ser-GSTs) which include the GSTU, F, Z, T and TCHQD classes and cysteine-containing GSTs (Cys-GSTs) which include the GSTL, GSTI, GSTH, DHAR, GHR and mPGES-2 classes [7]. The catalytic residue in GSTs of the metaxin, EF1B γ and Ure2p classes is still uncertain. Ser-GSTs usually catalyze GSH-conjugation and/or peroxide reduction. GSTs of the Zeta class are particular, being involved in tyrosine catabolism through an isomerase activity [8]. On the other hand, Cys-GSTs cannot perform GSH-conjugation reactions but instead catalyze thiol-transferase, DHAR and deglutathionylation reactions. Hence, the nature of the catalytic residue is critical in determining the type of reaction

catalyzed. This is so true that substituting the catalytic serine into a cysteine in some Ser-GSTs or the catalytic cysteine into a serine into some Cys-GSTs is often sufficient to shift from one activity type to another [9, 10]. Most plant GST classes contain only a handful of sequences, generally between 1 to 5 members. However the GSTF and GSTU classes are usually larger. Moreover, they often share high sequence identities and are arranged in clusters as a consequence of several rounds of tandem duplication and large scale duplication events. For instance, the *Populus trichocarpa* and *Arabidopsis thaliana* genomes contain 8 and 13 GSTFs and 55 and 28 GSTUs respectively which account for roughly 75% of the GST genes encoded by these genomes [11, 12]. These proportions may be inverted in some species since *Triticum aestivum* possesses 38 GSTFs and 26 GSTUs [13]. It is still not understood why so many isoforms have appeared and have been conserved in the genomes of vascular plants. For the GSTU class, it is remarkable that the moss *Physcomitrella patens* has no *GSTU* gene while the lycophyte *Selaginella moellendorffii* has 47 predicted *GSTU* genes [14].

The fact that specific subsets of GSTs are regulated in response to developmental and environmental signals such as during senescence, xenobiotic or heavy-metal exposure, drought, pathogen attack, wounding, hypoxic stress, suggests that some of these GSTs may have acquired specialized functions in response to specific conditions [11, 15-17]. However, identifying the physiological roles of Ser-GSTs has been somehow troublesome in the past possibly because they have non-essential roles or because the functional redundancy is high, even between classes. For instance, the biochemical characterization of GSTFs and GSTUs showed that their catalytic activities towards herbicides or other model substrates broadly overlap [12, 18-20]. On the other hand, to illustrate the first point, it is worth mentioning that mutating multiple GSTF isoforms in *A. thaliana* in a reverse genetic approach did not lead to strong phenotypes but only to minor metabolism changes [21]. Overall, this may point to the promiscuity of these enzymes, having possibly evolved to catalyze similar reactions on close compounds as it is the case for cytochrome P450 monooxygenases [22].

Despite this, some studies highlighted the existence of specificities among GSTF members. A study focusing on 6 GSTFs from *T. aestivum* induced upon herbicide, safener and flavonoid exposures showed that they have variable biochemical and enzymatic properties [23]. Two of these GSTFs have a high peroxidase activity compared to the others. Among the GSTFs exhibiting a moderate peroxidase activity, the two isoforms with the higher GSH-conjugating activities with CDNB are also inhibited by flavonoids, while the two others are not [23]. In fact, this glutathione peroxidase activity seems to represent another important facet of Ser-GSTs. Indeed, when *A. thaliana* plants express such a GST with high

peroxidase activity from the black-grass *Alopecurus myosuroides*, which is found at a high constitutive level in this species, they acquire multiple herbicide resistance, concomitantly with the accumulation of flavonoids [24]. Overall, this activity may be critical to control the level of fatty acid hydroperoxides whose byproducts may be harmful but at the same time signaling molecules.

Another example showing the importance and sometimes specific roles played by GSTFs is their requirement, together with glutathione, for the biosynthesis of secondary metabolites bearing a sulfur atom. In *A. thaliana*, GSTF6 would participate to the synthesis of camalexin by catalyzing GSH conjugation to an intermediate product, indole-3-acetonitrile [25]. Although this remains to be demonstrated, it is likely that GSTFs could be also important for the biosynthesis pathway of glucosinolates in *A. thaliana*. For both pathways, it seems that cytosol gamma-glutamyl peptidases (GGPs) are important for the catabolism of these glutathionylated intermediates [26], suggesting that the formation and degradation of glutathionylated intermediates in the synthesis of secondary metabolites may be more widespread than currently believed. More generally, the fact that these glutathionylated products are rarely identified by metabolomic approaches may rely to their transient nature or to the fact that they are rapidly processed to derived metabolites and likely do not accumulate.

The last identified major functional aspect of these enzymes is the ability of GSTFs to bind molecules non-enzymatically, as shown for auxin and cytokinin [27, 28], anthocyanins [29] or flavonoids (quercetin, kaempferol) and related heterocyclic molecules (harmaline, norharmaline, indole-3-aldehyde) [30, 31]. While the role associated to the binding of hormones and flavonoids is not clear, it seems clear that GSTFs participate to the transport and vacuolar sequestration of anthocyanins. Indeed, mutants failing to express a specific highly conserved GSTF in *Petunia hybrida*, *A. thaliana*, *Vitis vinifera* or *Dianthus caryophyllus* display colorless vacuole phenotypes [32-35].

Understanding the GSTF diversity may also come from structural studies, however, only 4 GSTF structures have been solved so far (PttGSTF1, AtGSTF2, maize GST-I and GST-III) [10, 36-39]. As most GSTs, these enzymes exist as homodimers, the dimerization interface involving hydrophobic surface patches and a particular lock-and-key motif in which the side chain of an aromatic residue extends across the dimer interface and locks into a hydrophobic pocket between helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$ of the C-terminal domain. Each monomer of GST possesses two spatially distinct domains: a conserved N-terminal domain adopting a thioredoxin fold ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$) linked by a variable linker of approximately 10 amino acids to a more variable C-terminal domain composed of 8 α -helices for GSTFs [10, 38, 39]. The active

site is formed by a GSH-binding site (G-site) involving residues from the N-terminal domain and by a substrate binding site (H-site) constituted by non-polar residues originating from both domains.

In the present study we report the characterization of the GSTF class of *P. trichocarpa*. After producing and purifying recombinant proteins, the diversity among family members has been characterized with regard to their biochemical and structural properties. The results indicate that within the GSTF class, modifications in the active site sequence and structure that have appeared during evolution account for the acquisition of a new activity profile and generated functional diversity which should explain at least partially the GSTF family expansion.

Materials and methods

PCR cloning and site-directed mutagenesis

The coding sequences of GSTF2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 were amplified from *Populus trichocarpa* female flower or leaf cDNAs or from *P. trichocarpa* x *P. deltoides* Beaupré using specific primers (Table S1) and were cloned either into pET3d between *NcoI* and *BamHI* restriction sites for GSTF2 and GSTF8 or into pET12a between *NdeI* and *BamHI* restriction sites for other GSTFs. All amplified coding sequences matched the genes found in the *P. trichocarpa* reference genome, except GSTF3 which has a histidine instead of a glutamate at position 60 and GSTF4 which is clearly a *P. deltoides* allele since it is perfectly identical to two EST sequences (DT507646 and DT51666) from this species. It differs from the *P. trichocarpa* reference genome in 7 positions, Thr11, Ala16, Phe 20, Glu29, Gly142, Val147 and His181 are replaced respectively by an Ala, a Thr, a Leu, an Ala, a Val, an Ile and a Gln. Various catalytic mutants for GSTF3, 7 and 8 were generated by site-directed mutagenesis using two complementary mutagenic primers (Table S1) following a previously described method and cloned into pET12a [10]. The sequences have been confirmed by DNA sequencing.

Heterologous expression in E. coli and purification of the recombinant proteins

The *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain containing the helper plasmid pSBET was transformed with expression plasmids and subsequently grown in LB medium at 37°C containing kanamycin (50 µg/ml) and ampicillin (50 µg/ml). When the bacterial culture reached exponential phase characterized by an absorbance at 600_{nm} of 0.7, the expression of recombinant proteins was induced by adding 0.1 mM of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside and cells were further grown for 4 additional hours at 37°C. Bacterial cells were then harvested by centrifugation (30 min, 6200 g) and the pellet resuspended in a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl buffer was frozen. After thawing the cells, lysis was completed by two rounds of sonication of 2 minutes and the soluble fraction was separated from cellular debris and protein aggregates by centrifugation (30 min, 27000 g, 4°C). The supernatant of the cell lysate was then precipitated with ammonium sulfate to successively 40 and 80% of the saturation. After analysis on SDS-PAGE, the fraction containing the majority of recombinant proteins was subjected to a size-exclusion chromatography by loading the protein extract on an Ultrogel® ACA44 (5 × 75 cm, Biosepra)

column equilibrated with a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl buffer. The fractions contained the recombinant protein were subsequently pooled and dialyzed to remove salt by ultrafiltration in Amicon cells with an YM10 membrane (Millipore) and loaded onto a DEAE-cellulose column (Sigma Aldrich) equilibrated with a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA buffer. When recombinant proteins were retained (GSTF3, F7 and F8 as well as catalytic variants of these isoforms), they were eluted using a 0 to 0.4 M NaCl gradient, dialyzed again, concentrated and finally stored in 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl buffer. When they were not retained (GSTF2, F4, F5 and F6), the flow through was directly concentrated and stored in the same buffer as above. Protein purity was assessed by SDS-PAGE analysis. Protein concentrations were estimated by measuring the absorbance at 280 nm using specific theoretical molar extinction coefficients determined for each protein using the ExPASy ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>).

In order to increase protein purity or to assess the presence of bound GSH, 5 mg of purified GSTFs were systematically loaded onto a glutathione sepharose 4B column (GE Healthcare) equilibrated with PBS buffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4). After extensive washing steps with the same buffer, proteins were eluted with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM GSH buffer and analyzed by SDS-PAGE.

Enzymatic activities

The GSH conjugation activity towards phenethyl isothiocyanate (PITC), benzyl isothiocyanate (BITC), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and 4-nitrophenyl butyrate (PNP-butyrate) was assayed at 25°C in 500 µL reaction mixture using a spectrophotometric detection as described previously [10]. For each substrate, the used concentration range, monitored wavelength, molar extinction coefficient and buffer have been indicated into brackets: PITC (50 to 500 µM; 274 nm ; 9250 M⁻¹.cm⁻¹ ; 100 mM phosphate buffer pH 6.5), BITC (100 to 1000 µM ; 274 nm ; 9600 M⁻¹.cm⁻¹ ; 100 mM phosphate buffer pH 6.5), CDNB (500 to 6000 µM ; 340 nm ; 17700 M⁻¹.cm⁻¹ ; 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA), PNP-butyrate (50 to 5000 µM ; 412 nm ; 13750 M⁻¹.cm⁻¹ ; 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.5).

Thiol-transferase, dehydroascorbate (DHA) reductase and peroxidase activities have been measured in 500 µL reaction mix at 25°C toward 2-hydroxyethyl disulfide (HED), DHA, and cumene hydroperoxide (CuOOH) based on a NADPH-coupled spectrophotometric assay. The assays were performed in 30 mM Tris-HCl pH 8.0 in the presence of 200 µM NADPH, 150 nM glutathione reductase (GR), 2 mM GSH and varying concentrations of HED (125 to 4000

μM), DHA (250 to 5000 μM), and CuOOH (50 to 7500 μM). This is clearly a saturating GSH concentration ($>10 K_m^{\text{GSH}}$) for most proteins except GSTF8 that possesses a higher K_m for GSH and for which a 3 mM concentration was used. For the aforementioned enzymatic assays, reactions were started by addition of the enzyme at concentrations varying according to the substrates but always within the linear response range (0.1 to 5 μM). The consumption of NADPH was followed at 340 nm and activities calculated using a specific molar absorption coefficient of 6220 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. The spontaneous reaction rate of GSH with substrates was subtracted to the enzymatic reaction rate. Enzymatic assays were performed in triplicate for each substrate concentration and data were fitted to a Michaelis-Menten non-linear regression model using GraphPad Prism 5[®] software.

Thiol titrations

The number of free thiol groups in as-purified or reduced recombinant GSTFs was assessed using 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Each protein at a concentration of 30 μM was denatured using 6M guanidine hydrochloride in 500 μL . After adding 200 μM DTNB and a dark incubation of 30 minutes, absorbance at 412 nm reflecting the release of a TNB-molecule per thiol group was measured. The number of SH groups was determined from a molar absorption coefficient of 13600 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ at 412 nm. The protein:SH group ratio was used to determine the number of free thiols per protein. When proteins were reduced prior to thiol titration, excess DTT was removed by precipitation with 10% trichloroacetic (w/v) acid (TCA) for 30 min on ice. The mixtures were then centrifuged for 15 min at 14,000 g and the pellets washed three times with 1 ml of 2% TCA. The pellets were finally resuspended in 500 μL 6M guanidine hydrochloride and the rest of the procedure was as above.

Determination of the apparent molecular masses by analytical size exclusion chromatographies

The apparent molecular masses of purified proteins were determined by size exclusion chromatography on a Superdex 200 10/300 column equilibrated with a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl buffer and connected to an Akta purifier system (GE Healthcare). 100 μg proteins were injected at a flow rate of 0.5 ml/min. The apparent molecular masses were deduced from their retention time in comparison to standards (6500–669,000 Da) from Sigma-Aldrich.

Electrospray mass spectrometry analysis

The molecular mass analyses were performed by high resolution electrospray ionization-MS spectra on a Bruker microTOF-Q spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an Apollo II electrospray ionization source with an ion funnel and operated in the negative ion mode as described previously [10].

pKa determination

The cysteine pKa have been measured using pre-reduced proteins using iodoacetamide (IAM) for SDS PAGE visualization or using a derivative fluorescent version, fluorescein-iodoacetamide for fluorescence measurement. Both molecules react with thiolate but not thiol groups. For IAM treatment, 10 μ M of recombinant proteins were incubated during 2 h under shaking with a 10 fold excess IAM in 50 μ L of 100 mM sodium citrate, phosphate or borate buffers with one pH unit interval ranging from pH 3 to 10. Excess IAM was removed by precipitating proteins with 10% TCA on ice. After centrifugation (10 min - 14000 g) and two washing steps with 100 μ L of 100% cold acetone, proteins were resuspended in 10 μ L of a 100 mM Tris HCl pH 8.0, 1%, SDS, 2 mM 2 kDa mPEG-maleimide buffer by shaking during 15 min and then analyzed by non reducing 15% SDS-PAGE. For fluorescein-IAM treatment, 5 μ M proteins were incubated during 15 min with 50 μ M fluorescein-IAM in 200 μ L of 100 mM sodium citrate, phosphate or borate buffers. After the same precipitation and washing steps as above, the protein pellets were resuspended in 400 μ L of a 100 mM Tris HCl pH 8.0, SDS 1 % buffer. The fluorescence was measured at 518 nm after excitation at 494 nm using a Cary Eclipse spectrofluorometer (Agilent) and the pKa values were calculated by plotting fluorescence values as a function of pH and using a sigmoidal dose-response standard curve model and the GraphPad Prism 5 software. Fluorescence excitation voltage was set up from 600 to 750 V in order to optimize fluorescence values for a given GSTF.

Crystallization and X-ray crystallography

GSTF2, F5, F7 and F8 were crystallized using the microbatch under oil method at 4°C. The crystallization conditions are summarized in Table 1. Diffraction data of GSTF crystals were collected on beamline FIP-BM30A at ESRF (France). Their data sets were indexed and

processed using XDS [40] and scaled and merged with Scala [41] from the CCP4 program package [42]. Both structures were solved by molecular replacement with Molrep [43] using GSTF1 as first search model (pdb entry 4RI6). Structures were refined using automatic calculations from PHENIX [44] with manual inspection and corrections using Coot [45]. The validation of the 4 crystal structures was performed with MolProbity [46]. The crystallographic statistics are listed in Table 2.

Results

Poplar GSTFs are all dimeric proteins with different capacities to bind glutathione

In a previous work, we have investigated the structural and biochemical properties of poplar GSTF1 [10]. In order to gain insights into the whole GSTF class in poplar, the properties of the 7 other members (GSTF2 to GSTF8) were systematically investigated. Based on the overall sequence similarities and on the 4-residue active site signatures, 4 subgroups have been distinguished. The first subgroup is formed by GSTF1 and F2 which have a STAV active site motif, GSTF3 and F7 form another subgroup with a STCT motif, GSTF4, F5 and F6 display STAT or STNT motifs and group together, whereas GSTF8 displays an atypical AVCP active site signature lacking the catalytic serine. It is clearly the ortholog (60 to 80% identity) of GSTFs involved in anthocyanin transport [32, 34]. This isoform is clearly divergent from all others whose active site motifs are of the STxx form.

After expression of the recombinant proteins in *E. coli* and purification, yield varied from 20 to 40 mg of purified proteins per liter of culture. The purified GSTFs were then subject to mass spectrometry analyses (Table 3). The differences with theoretical masses indicated that the N-terminal methionine was systematically cleaved for all poplar GSTFs as expected from the presence of either an alanine or a valine at the second position. In the case of GSTF3, F7 and F8, a mass increment of *ca* 305 Da was measured which infers the presence of a covalently-bound glutathione molecule. Interestingly, these three proteins contain a cysteine in the active site signature which could be responsible for GSH binding. Consistently, the titration of free thiol groups indicated that GSTF3, F7 and F8 have around one free thiol group for two cysteines whereas GSTF2 and F4 have the expected number of two thiol groups (Table 3). By reducing these enzymes with DTT, roughly 2 free thiol groups per protein could be measured. Incidentally, the reduced proteins tend to precipitate indicating that GSH binding may contribute to their stability. These results were further confirmed by the fact that none of the GSTF3, F7 and F8 isoforms were retained on GSH sepharose whereas other GSTFs were, at least partially as in the case of GSTF5 and F6. Since the experimental conditions used for mass spectrometry are denaturing and does not allow assessing the presence of non-covalently bound GSH, these results likely indicate that GSTF5 and F6 are purified as a mixture of GSH-bound and GSH-free forms. From analytical gel filtration experiments, the oligomeric state of these two forms is similar. Indeed, both isoforms, as all other GSTFs, elute as a single peak with an apparent molecular mass

comprised between 45 and 56 kDa and corresponding to dimers since monomers have a molecular mass ranging from 23 to 25 kDa.

GSH-conjugating activities of poplar GSTFs: substrate specificity and kinetic parameters

In order to investigate whether all poplar GSTFs have the classically observed GSH-conjugating or glutathionylation activity and peroxidase activities and whether they have preferential substrates, we have tested the capacity of each recombinant protein to conjugate GSH onto a set of model substrates namely CDNB, BITC, PITC, PNP-butyrate and to reduce CuOOH (Table 4) (Figure S1). All GSTFs displayed activity towards at least one substrate. The GSTF1, F2, F3, F4 and F7 were able to perform all reactions whereas GSTF5, F6 and F8 displayed some selectivity. None of the latter enzymes exhibited CuOOH reduction activity. Moreover, GSTF8 was unable to promote glutathione conjugation onto both isothiocyanate derivatives (BITC and PITC). Surprisingly, GSTF5 and F6 were able to discriminate among both molecules. While they were unable to catalyze GSH conjugation onto PITC, they did it using BITC although they possess the lowest catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) among active GSTFs. This indicates that small substrate variations are sometimes sufficient to modify their recognition and that the GSTF active site is somehow selective.

According to their higher sequence similarity and closer phylogenetic origin, enzymes belonging to the same subgroup usually showed similar catalytic profiles. This is true for the GSTF3-F7 couple, both proteins having comparable catalytic efficiencies for all substrates as well as for the GSTF1-F2 couple except for the peroxidase activity. We observed a difference of a factor 15 in the k_{cat}/K_m which reflects a huge difference in the apparent affinity, the K_m values for CuOOH are 592 μ M and 4067 μ M for GSTF1 and GSTF2 respectively. In the GSTF4, F5 and F6 subgroup, while GSTF5 and F6 have the same activity pattern, GSTF4 is clearly divergent. This could be related to the active site signature of GSTF4 (STAT) which is different from the one found in GSTF5 and F6 (ST T) and to its general divergence, the identity of GSTF4 with GSTF5 and GSTF6 being 67 and 66% respectively, whereas it is 98% between GSTF5 and GSTF6. Overall, while GSTF5 and F6 have a reduced spectrum of substrates and the lowest catalytic efficiency for most substrates except CDNB, it is interesting to note that other enzymes have their preferred substrates. Comparing all GSTFs, GSTF1/F2 and GSTF4 are the most efficient with CDNB, GSTF8 with PNP butyrate and GSTF3/F7 with both isothiocyanates (BITC and PITC) and CuOOH.

Since all poplar GSTFs were active in the GSH conjugation of CDNB, we used this test to evaluate affinities for glutathione (Table 5). In general, apparent K_m values are quite low indicating that the affinity for GSH is good. They ranged from 5.5 to about 154.1 μM with the notable exception of GSTF8 which possesses an apparent K_m value of 645.9 μM . Isoforms of the GSTF4, F5 and F6 subgroup have in common these low K_m values (below 20 μM) compared to isoforms of the GSTF1-F2 and F3-F7 subgroups which have K_m values above 48 μM .

Reductase activities of poplar GSTFs: kinetic parameters and pKa measurements

The presence of a cysteine in the active site of GSTF3, F7 and F8 and the observation that these proteins are purified with covalently-bound glutathione prompted us to investigate whether these enzymes display enzymatic properties typical of Cys-GSTs. Thiol transferase and dehydroascorbate reductase activities were investigated using HED and DHA respectively. Among all GSTFs, only these cysteine-containing GSTFs were active using these substrates. Whereas GSTF8 was only active towards HED, GSTF3 and F7 were active towards both substrates, although they were more efficient using HED (k_{cat}/K_m around 10^2 to $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) mainly because the apparent K_m values for DHA were very high (Table 4).

Then, we sought to determine the pK_a values of these cysteines. All these proteins contain two cysteine residues, one at position 13 within the active site signature and one at position 20 which is also found in GSTF4. In order to remove covalently-bound GSH present on the active site cysteine upon purification, all proteins have been reduced with an excess of DTT and dialyzed. Moreover, we have used both intact proteins and protein variants in which Cys13 is replaced by an Ala to discriminate both cysteines. The pK_a values have been determined by incubating pre-reduced proteins at various pH with IAM or a fluorescent derivative, both molecules reacting with thiolates but not with thiol groups. When IAM was used, an additional incubation step with 2 kDa mPEG-maleimide was performed to alkylate remaining thiol groups that did not react with IAM. Hence, after a separation on non-reducing SDS-PAGE gels, a shift of 2 kDa should be visible for all protonated cysteines at a given pH. Two migration shifts between pH 5 and 6 and between pH 9 and 10 are clearly visible for all proteins (Figure 1). Since the shift between pH 5 and 6 is not seen for C13A variants (Figure S2), this indicate that Cys13 has a pK_a comprised between 5 and 6 and Cys20 a pK_a comprised between 9 and 10. In order to refine these values for each GSTF, an alternative approach based on the alkylation of cysteine thiolates by fluorescein-IAM was used on the

same proteins. By plotting fluorescence intensity values against pH, pKa values of 5.12 ± 0.13 , 4.99 ± 0.11 and 5.19 ± 0.12 have been determined for Cys13 of GSTF3, GSTF7 and GSTF8 respectively and values of 9.77 ± 0.22 , 9.75 ± 0.35 and 9.75 ± 0.24 for Cys20 of GSTF3, GSTF7 and GSTF8 respectively (Figure 1).

Using site-directed mutagenesis to explore the role of active site residues

Having observed that GSTF3, F7 and F8 display both glutathionylation and deglutathionylation activities and that GSTF8 can catalyze glutathionylation in the absence of the typical serine residue, we have investigated the catalytic versatility of these enzymes using site-directed mutagenesis. Hence, 9 protein variants (3 per enzymes) bearing single or double substitutions for residues found at positions equivalent to Ser11 or Cys13 in GSTF3 have been generated. All these variants were produced to similar extent to the intact proteins and no difference was observed in terms of solubility or stability of the recombinant proteins, suggesting that introducing these mutations does not affect the global protein folding. Since the behavior observed for the mutated variants of GSTF3 and GSTF7 which have the same STCT active site signature is similar, the results will be discussed together whereas the results obtained for GSTF8 will be described separately.

As expected, substituting the cysteine by an alanine in both GSTF3 and GSTF7 (C13A variants) totally abolished activities towards HED and DHA (Table 6). On the other hand, this change has not much impact on the GSH-conjugation reactions since K_m , k_{cat} and thus k_{cat}/K_m values did not vary more than a factor 2 to 3. Nevertheless, the K_m value for GSH is affected in both mutants which displayed an increase of the apparent affinity for GSH of a factor 7.4 and 2.7 for the GSTF3 C13A and GSTF7 C13A variants respectively (Table 5). These values (18 μ M) are now in the range of the best values exhibited by isoforms of the GSTF4-F5-F6 subgroup. This seems to indicate that the presence of the Cys13 somehow impairs GSH binding, but the effects are not really visible on the catalytic activities recorded for other substrates because of the use of saturating GSH concentrations.

The variants of GSTF3 and GSTF7 without serine at position 11 (S11A or S11A, C13A) have globally the same changes in activity compared to the non-mutated enzymes and will be described together. Of course, the S11A/C13A variants are inactive in the DHA and HED assays owing to the absence of the cysteine. For these two reactions, it is interesting to note that substituting the serine by an alanine (S11A variants) increased the catalytic

efficiency by a factor 10 to 20 due to both a better apparent affinity and a higher k_{cat} (Table 6). Hence the absence of serine seems to favor the reactivity of Cys13 although K_m values for GSH in the GSTF3 S11A and GSTF7 S11A variants are increased by factors ~ 13 and ~ 10 respectively (Table 5). Regarding the GSH conjugation reactions, serine mutation had variable effects depending on the substrate considered. Indeed, there was no dramatic change in the k_{cat}/K_m values for CDNB, PNP-butyrate and CuOOH, except for the GSTF3 S11A variant with CDNB whose catalytic efficiency was decreased by a factor ~ 6 . The situation was different with PITC and BITC since all serine-less variants became completely inactive towards both isothiocyanates derivatives.

Concerning GSTF8, despite the serine is naturally absent from the AVCP catalytic motif, it exhibited a good GSH-conjugation activity with CDNB and PNP butyrate. Moreover, in accordance with the presence of a cysteine, it showed a weak deglutathionylation/reductase activity with HED but not with DHA. As observed for GSTF3 and F7, substituting Cys13 by an Ala abolished the latter activity which was expected (Table 6). Surprisingly, this GSTF8 C13A variant also lost the capacity to perform GSH-conjugation reactions since no detectable activity was recorded using CDNB and PNP-butyrate as substrates. Then we sought to introduce the “regular” serine at position 11 to mimic other naturally-existing GSTFs, in particular GSTF3 and GSTF7. As for the GSTF8 C13A variant, no glutathionylation or deglutathionylation activity was detected for this GSTF8 A11S variant. The reasons for the inactivity of the GSTF8 C13A and S11A variants are unclear but this may be related to conformational changes in the active site that destabilize the protein and/or are unfavorable for substrate recognition and catalysis. Finally, we have introduced a serine at the position occupied by the cysteine to generate a GSTF8 C13S variant. Whereas this variant exhibited the expected loss of deglutathionylation activity, it kept GSH-conjugation activity with CDNB and PNP butyrate though k_{cat}/K_m is decreased for the latter substrate. More interestingly, this variant acquired a glutathionylation activity towards isothiocyanate derivatives. The measured catalytic efficiencies (2.1×10^4 and $1.49 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ for PITC and BITC respectively) are extremely high being 10 to 100 fold higher than those of other GSTFs. As observed for the GSTF3 and GSTF7 C13A variants, the affinity for GSH is strongly increased in the GSTF8 C13S variant, the apparent K_m values dropping from 645.9 to 12.6 μM (Table 5). Altogether, these results show that a single amino acid exchange in position 11 or 13 can result in a huge difference of activity and illustrate the flexibility existing at the level of the residues forming the active site signature in GSTFs.

Determination of the 3D structures in complex with GSH supports the observed versatility among active site residues

Considering the variations observed in the active site motifs and in kinetic parameters (substrate affinities, catalytic efficiencies), especially between isoforms of different subgroups, we sought to compare the 3D structures of at least one representative isoform of each subgroup. Fortunately, crystal structures of GSTF2 (active site motif STAV), GSTF5 (STNT motif), GSTF7 (STCT motif) and GSTF8 (AVCP motif) were obtained and compared to the previously obtained GSTF1 structure [10]. In all cases, but GSTF2, initial Fourier maps clearly revealed a large positive peak in the G-site attributed to a glutathione molecule. This molecule was non-covalently bound in GSTF5. In GSTF7, the distance of 3.2 Å between the sulfur atoms of the glutathione and the cysteine of the active site motif (Cys13) did not fall within the range of expected disulfide bond length (~ 2.05 Å). Since GSH was covalently bound to recombinant GSTF7, the intermolecular disulfide bridge was most likely cleaved during the X-ray data collection. In contrast, the crystallographic refinement of GSTF8 structure was in agreement with mass spectrometry analysis since the refined model contained a disulfide-bridged GSH in the G-site.

All GSTF structures solved in the present study adopt the canonical GST tertiary and quaternary structures as GSTF1 [10]. Each subunit of the dimers consists of an N-terminal thioredoxin-like domain ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$) followed by an all-helical C-terminal domain ($\alpha_4\alpha_5\alpha_6\alpha_6'\alpha_7\alpha_8$) (Figure 2). Structures of all GSTFs superimposed well with a mean RMSD of 0.64(0.15) Å and an average of 166(5) residues superimposed. According to their belonging to the same subgroup, the closest models were those of GSTF1 and F2 (RMSD of 0.28Å for 162 residues superimposed) which share the highest sequence identity (74%). The most noticeable differences were observed in the β_2 - α_2 , β_3 - β_4 and α_3 - α_4 loops and in the segment from roughly the C-terminal end of α_4 to the N-terminal end of α_5 (Figure 3). This latter and the loop β_2 - α_2 are part of the active sites which are solvent-exposed and thought to be critical for the electrophilic-substrate recognition [10, 30].

The comparison of the structure of GSTF2 (without GSH) with those of GSTF1, F5, F7 and F8 (with GSH) did not reveal large conformational changes upon GSH-binding. Four anchoring points for GSH binding can be found in the G-site of GSTFs. The motif ⁶⁷ESR (GSTF5 numbering) located at the N-terminal end of α_3 stabilizes the glutamyl group of GSH through hydrogen bonds and Coulomb interactions. The motif ⁵⁴QV/IP preceding β_3 is

hydrogen bonded to the main chain of the GSH-cysteine moiety and stabilizes the C-terminal part of GSH. This C-terminal part interacts also with the motif ⁴¹Q/HK found in the loop β 2- α 2. The fourth anchoring point is the active site motif (N-terminal end of α 1) which is in the vicinity of the GSH thiol group (Figure 4). In GSTF5 (motif STNT) the lateral chains of the first three residues of the active site signature are indeed in the right position to have a role in catalysis. Indeed their polar groups were at a distance of less than 4 Å from the GSH sulfur atom. The same was observed in the structure of GSTF7 (motif STCT) albeit there are a few conformational changes. In GSTF8 (motif AVCP) the cysteine of the motif is the only polar group near the GSH sulfur atom. The edges of the H site were defined from a MES molecule in the GSTF1 structure [10]. The MES molecule is surrounded by the residues ¹²LST from the β 1- α 1 loop, ³⁷L from the β 2- α 2 loop, ¹¹⁹H and ¹²³F from α 4. The analysis of the GSTF structures solved in this study revealed subtle differences which modified the physico-chemical properties and the sizes of the respective H-sites. While GSTF1, -2, -5 and -7 have some polar residues, they are exclusively aliphatic in GSTF8 (Figure 4).

Discussion

Previous phylogenetic analyses indicated that GSTFs are only found in the green lineage and very likely in some fungi although none of them has been characterized so far [10, 47]. In fact, among photosynthetic organisms, GSTFs are only present in terrestrial plants, the number of genes ranging from 1 in *Selaginella moellendorffii* to 27 in *Aquilegia coerulea* [10]. The observation of such gene family expansion in specific species strongly argues for the occurrence of gene duplication in a species-specific manner. In principle, such expansion by gene duplication should be followed by neo- or sub-functionalization but this assumption needs to be validated for the GSTF class because numerous duplicated genes are highly similar. For instance, poplar GSTF5 and F6 share more than 98 % sequence identity. Hence, the presence of eight genes in *P. trichocarpa* raises the question of their potential redundancy or specificity. Performing genetic studies is not trivial in poplar and such an approach has been unsuccessful in *Arabidopsis* likely because of some functional redundancy exists between isoforms [21]. Since the expansion of gene families in particular organisms is often explained by the existence of specific gene expression patterns either among cell, tissues or organs or in response to various biotic and abiotic stresses as already shown for the GSTF class in *Arabidopsis* [17, 21], we have initially tackled the question of the GSTF specificity/redundancy in poplar by analyzing the transcript expression patterns of all *GSTF* genes in several organs. However, it turned out that they redundantly accumulate in reproductive organs and leaves [10]. It remains to be seen if they present specific stress-induction patterns, but the expression criterion does not allow discriminating poplar GSTFs so far. Moreover, because all poplar GSTF proteins are predicted to be cytosolic, a difference in subcellular localization should not be a major factor explaining these expansions. Note however that in *Arabidopsis thaliana* 3 out of 14 isoforms present extra-cytosolic localization but this is often dual targeting. Hence, in addition to a cytosolic localization, the GSTF12/TT19 is also partially associated to the tonoplast, GSTF2 may also be targeted to the chloroplasts although there is no visible N-terminal targeting sequence and in the case of GSTF8, a plastidial localization arises from the existence of an alternatively spliced transcript [18, 29, 48, 49]. Hence, to further explore the question of redundancy in the poplar GSTF class, we have performed in the present study a thorough comparative enzymatic and structural analysis. As discussed below we have observed that primary and tertiary sequence variations in the active site signature can generate diversity in the biochemical and enzymatic properties. This is consistent with genomic analyses showing variations in the active site

motifs within some GST classes and with some recent biochemical studies on other GST classes.

GSTFs of the same subgroup usually exhibit similar substrate specificities and catalytic efficiencies but with some differences

All poplar GSTFs displayed GSH-conjugating activity at least towards some tested model substrates with catalytic efficiency levels in the same range of those previously reported for GSTF orthologs *i.e.*, around 10^2 to 10^3 [14, 17, 18]. In poplar, according to their evolutionary origin, GSTFs of the same subgroup which usually means the most recently duplicated, display very comparable patterns of substrate specificity and catalytic efficiency. Hence, in this part, we will not develop much this observation as it was already extensively described in the results section, but focus more on counterexamples. One example is the difference between GSTF4 which exhibits all glutathionylation activities tested and peroxidase activity and GSTF5/F6 which lack peroxidase activity and GSH-conjugating activity towards PITC. Another example is exemplified by GSTF1 and F2 which share ~75 % sequence identity. Whereas both enzymes exhibited comparable kinetic parameters for all tested substrates, the catalytic efficiency of GSTF1 towards CuOOH is about 16 fold higher than the one of GSTF2 which is mostly explained by a difference in the apparent affinity (Table 4). Hence, the obvious explanation should be a variation in the H-site. Consistently, inspecting the amino acid sequences and the 3D structures of both proteins points to the presence of 3 extra amino acids in GSTF2 which are positioned downstream the $\alpha 4$ helix at the level of the H-site. It is thus possible that this difference would generate variations in the H-site topology which accounts for the difference in peroxidase activity. Focusing on the peroxidase activity, it is important to note first that not all GSTFs have this activity and second that there are important variations among GSTF isoforms. For instance, the catalytic efficiencies measured under steady-state conditions of both GSTF3 and F7 are around $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in the same order of magnitude of those reported for GSTFs defined as highly active GSH-peroxidases [24]. So they should be considered as well, together with GSTF1, as highly active GSH-peroxidases. To understand whether this glutathione peroxidase activity is relevant in plants, we sought to compare with other known thiol-dependent peroxidases. We can exclude from this comparison heme-containing peroxidases as catalases and ascorbate peroxidases which are certainly very efficient but specific to H_2O_2 contrary to thiol peroxidases which reduce a broader range of peroxides and to GSTFs that are not active with

H₂O₂. In fact, most plant thiol peroxidases, including peroxiredoxins and the so-called glutathione peroxidases are dependent on thioredoxins [50]. Only a specific plant peroxiredoxin subgroup named Prx II possesses GSH-dependent peroxidase activity but it usually requires glutaredoxins as intermediate catalysts [50]. The catalytic efficiencies measured under steady-state conditions of all these thiol peroxidases such as Prx Q, Prx IIE, PrxIIF or Gpx5 are globally quite comparable or slightly above being often in the range of 10³ to 10⁴ M⁻¹ s⁻¹ [51-54]. Hence, at this stage, the peroxidase activity of GSTFs appears to be relevant for peroxide removal in plants first because it relies on a different reducing system (GSH vs thioredoxin) except for the Prx II subgroup. Moreover, the fact that they reduce complex peroxides as those that could be formed at the levels of membranes and HNE, a toxic byproduct of lipid peroxidation [10], increases the interest for the cells to have such GSH-dependent peroxidase activity.

A last divergence among GSTFs for substrate specificity concerns the apparent affinities for GSH which vary by a factor ~130 from 5 to 645 µM. The variations are between subgroups rather within subgroups since the GSTFs of the GSTF4, F5 and F6 subgroup have in common K_m values below 20 µM whereas isoforms of the GSTF1-F2 and F3-F7 subgroups have K_m values ranging from ~50 to ~150 µM. The GSTF8 is the one in the upper range. These differences are somehow surprising considering that GSH position in the GSTF G-site is relatively invariant and that residues involved in its binding are very much conserved. It is also worth mentioning that these values are pretty good compared to those measured for Cys-GSTs as plant GSTLs, DHARs and GHRs, fungal and human GSTOs or Grxs which have K_m in the mM range [9, 55, 56]. From the differences observed with intact enzymes and variants mutated for active site residues, it clearly appears that residues of the active site signature have balanced effects on this parameter. Indeed, mutating the Ser11 in GSTF3 and F7, thus mimicking GSTF8, considerably decreased enzyme affinity for GSH by a factor 10 or more. On the other hand, mutating the Cys13 present in GSTF3, F7 and F8 increased affinity for GSH up to the best values *i.e.*, below 20 µM (Table 5).

Is the Cys present in some GSTFs really relevant for catalytic activity?

In the course of this work, we have observed that GSTF3, F7 and F8 possess activities typical of Ser-GSTs (GSH conjugating and peroxidase activities) and of Cys-GST

(deglutathionylation or reductase activities). Such dual activity profile has never been reported for plant GSTs but it should be widespread in the plant kingdom since the STCT signature found in poplar GSTF3 and GSTF7 is present in many proteins including two isoforms found in the non vascular plant, the moss *Physcomitrella patens*, and in the single isoform found in the lycophyte *Selaginella moellendorffii*. From the mutational analysis, the deglutathionylation activity is strictly dependent on the presence of Cys13. However, the catalytic efficiencies obtained for these cysteine-containing GSTFs (around 10^2 to 10^3 M⁻¹ s⁻¹) are much lower compared to those obtained for plant Cys-GSTs of the GSTL or GHR classes or with plant GRXs which are more in the range 10^4 to 10^5 M⁻¹ s⁻¹, raising the question of the physiological relevance [9, 55, 56].

To our knowledge, only a few other examples of such dual activity exist. The TCHQD from *Sphingobium chlorophenolicum* also referred to as PcpC is clearly one of these prototypes. It possesses an ¹¹SICS¹⁴ active site sequence very conserved among bacteria. For the reductive degradation of pentachlorophenol, the enzyme catalyzes both glutathionylation (for initial dechlorination) and deglutathionylation reactions and the Cys13 is clearly required for the second reaction [57]. This cysteine is not conserved in plant TCHQD orthologs, some of them having for instance SIDS signatures. The other example is the *Proteus mirabilis* GSTB-B1 which belongs to the bacterial-specific Beta class and displays a ⁹SCSL¹² catalytic motif [58]. As observed for the poplar GSTF3 and F7, the Ser9 in GSTB-B1 is not required for GSH-conjugation reaction since its mutation to Ala did not prevent Ser-GST activity whereas Cys10 is mandatory to the Cys-GST activity type as shown by the fact that a C10A variant is inactive in the HED assay [58, 59]. This may not represent an isolated example since the cysteine is conserved in many other bacterial GSTBs although in variable motifs, very often ACSL.

According to the reactivity of the cysteines in these isoforms, the pKa is decreased to 5.2 in *P. mirabilis* GSTB-B1 [58] and to 5.12, 4.99 and 5.19 in GSTF3, F7 and F8 respectively. As a matter of comparison, these values are quite similar to those measured for the catalytic cysteine of the CPFC/S motif found in DHAR1 (4.5) (Lallement et al, submitted) and of the CPYC or CPFC motifs found in several poplar glutaredoxins, around 4.6 for GrxC3/C4 and around 5 for GrxC1/C2 [55]. In thioredoxin superfamily members, there are multiple factors involved in the lowering of the pKa of the catalytic cysteines. The location of the catalytic cysteine at the N-terminal extremity of the α 1 helix is one important factor since it was shown that such helix acts as dipole leading to cysteine ionization [60]. Besides, their pKa is also lowered through hydrogen bond or hydrophobic interactions with the residue

located immediately upstream the invariant cis-proline, typically an isoleucine or a valine [61, 62]. The isoleucine found before the cis-proline in GSTF3 and F7 and the valine in GSTF8 are at interaction distance of the catalytic cysteine and therefore these residues are likely to contribute to the lowered pKa in these GSTFs. Also, investigation of surface electrostatic potential of GSTF7 and F8 reveals that the Cys13 chemical environment is highly electropositive and may contribute to lower catalytic cysteine pKa value by stabilizing the thiolate, as reported for *E. coli* thioredoxin [63].

Considering the rather poor catalytic efficiency of these GSTFs for deglutathionylation reactions and the fact that the presence of the cysteine also negatively affects glutathione binding, it is unclear why this cysteine has been retained in many GSTFs during evolution. One possible explanation is that these proteins have specific, yet unknown, glutathionylated substrates. Considering the case of GSTF8 orthologs, the major function of which seems to be associated with the non-catalytic transport of anthocyanins [29, 35], another explanation is that this cysteine is important for ligandin function. Indeed, as observed upon purification of the recombinant from *E. coli*, the GSTF3, F7 and F8 were completely glutathionylated. In this redox state, they should be catalytically inactive. Thus, it is tempting to propose that glutathionylation of this cysteine sustains ligandin function by blocking the G-site. Since this is reversible, this would be also a convenient way to regulate this non-catalytic activity. The capacity of glutathionylated GSTF8 to bind anthocyanins should be tested to address this point.

Shall we reconsider the split into Cys-, Ser- and Tyr-GST classes?

Besides the general degree of homology, GST classes have been classically defined as containing three types of catalytic residues. The cysteine reminiscent of the ancestor glutaredoxin domain and still present in several classes as DHARs, GSTLs, Beta GST (GSTB), would have been replaced by a serine located exactly at the same position during evolution in classes such as Phi, Tau, Zeta or Theta GSTs [64]. The serine and the cysteine are situated at the same position, in the β 1- α 1 loop just before the α 1 helix. In several isoforms mainly found in the mammalian alpha, mu and pi classes, the GSH-activation function is rather ensured by a tyrosine positioned at the end of the β 1 strand. This variation already illustrated the flexibility found in particular in the G-site of GSTs but the examples described above and below clearly add some complexity.

Most of the GSTFs bear a STxx signature consistent with their classification as serine-containing GSTs. However, a certain numbers of isoforms frequently display an alanine of this position, which is the case of poplar GSTF8 orthologs which possess AxCx motifs without any hydroxylated residue and more rarely a cysteine. Proteins with CPKR motifs are found in *Vitis vinifera* (GSVIVT01020831001), in *Medicago truncatula* (Medtr3g450930.1 and Medtr3g064700.1) and in *Manihot esculenta* (cassava4.1_016193m) and at least two sequences are supported by the presence of ESTs. Besides these sequence variations, the results obtained with poplar GSTF8, naturally without serine, or from the mutational analysis performed on poplar GSTF3, F7 and previously on poplar GSTF1 clearly indicate that the serine is not essential for the GSH-conjugating activity, although it does sometimes reduce the catalytic efficiency or totally abolish the activity as in the case of isothiocyanate substrates [10]. On the other hand, it was interesting to observe that, introducing a serine at position 11 in GSTF8 (GSTF8 A11S variant) does not allow catalyzing GSH-conjugation reactions whereas substituting Cys13 by a Ser (GSTF8 C13S variant) conferred a GSH-conjugating activity towards isothiocyanates. Remarkably, this variant is by far the most active of the poplar GSTF enzymes, having a k_{cat}/K_m increased by a factor 10 to 50. Incidentally, these results show that the position 13 is also optimal for Ser-GST activity type.

All these results point to the fact (i) that other mechanisms/residues should compensate for the lack of Ser11 to decrease the pKa of the cysteine of GSH and (ii) that several residues present in the active site signature and thus in the $\beta 1$ - $\alpha 1$ loop are adequate for catalysis as long as they adopt the right rotamers. The analysis of GSTF5 and GSTF7 structures is very informative in this respect. Indeed, it clearly shows that the thiol group of the cysteine in GSH is almost equidistant to the hydroxyl groups of Ser11 and Thr12 and to the sulfur atom of Cys13 in GSTF7 or to the nitrogen atom of Asn13 in GSTF5. This clearly supports the dual activity observed *in vitro* and the strong effects induced by the mutations on K_m^{GSH} . For instance, the C13A mutation leads to an increased GSH affinity very likely by facilitating interaction of GSH with Ser11 whereas S11A mutation may favor the covalent binding of GSH explaining why K_m^{GSH} values shift to the mM range, close to those found for so-called Cys-GSTs. Moreover, for the numerous isoforms having the STxx signature, it may be that Thr12 also participate to GSH activation by deprotonating it to GS^- through an hydrogen bond interaction. In the case of GSTF8, other mechanisms should be responsible for the deprotonation of the GSH thiol group which would explain the remaining glutathionylation activity. One element of answer could come from the study of *Anopheles dirus* GSTD3-3, an insect GST of the Delta class. By a mutational analysis, it was shown that

several residues (Ser65, Arg66, Asp100, Thr158 and Thr162) formed an electron-sharing network that assists the glutamyl-carboxylate of glutathione to function as a catalytic base participating to the glutathione ionization step by accepting the proton from its thiol group [65]. Since GSTF8 possesses amino acids identical to those found in GSTD3-3 or with similar properties (Ser67, Arg68, Glu103, Ser168, Thr173), it could be that it uses this “base-assisted deprotonation” mechanism for catalyzing GSH-conjugating activity.

It is interesting to note that the Phi class is closely related to the conserved eukaryotic Zeta class and that the active site signatures are very similar, STCT in of GSTF3 and F7 compared to the highly conserved SSCS motif in Zeta class members. The physiological function of GSTZs is to catalyze the isomerization of maleylacetoacetate to fumarylacetoacetate which is the penultimate step in the tyrosine and phenylalanine catabolism [66]. From mutagenesis performed on human GSTZ1-1 and *A. thaliana* GSTZ1, it was concluded that the first Ser is essential for this activity [66, 67]. Despite the Cys mutation also affected the measured reactions it was more attributed to the correct positioning of GSH rather than a direct catalytic role. However, a deglutathionylation activity was not considered in these studies. At the structural level, the active site of GST Zeta displays the same configuration than the one in GSTF7, the thiol group of GSH cysteine being roughly at equal distance of the hydroxyl moieties of the two serines and of the cysteine sulfhydryl group [66]. To conclude on that aspect, it would be interesting to compare the reactions performed by both type of enzymes and to assess in particular whether GSTFs, at least those with an STCT active signature, could catalyze these isomerization reactions. Of course the H-site is also very important for substrate recognition and could simply prevent such reaction to occur. In the case of GSTZ1, the H-site, which contains basic residues promoting the binding of the acid groups of maleylacetoacetate, is clearly more polar compared to typical GSTs [66].

To conclude on the plasticity of the GST catalytic motif, we find relevant to mention a few other examples that appeared during evolution. The GSTO and GSTL are included in the Cys-GST classes but there is quite a number of isoforms displaying a serine instead of the cysteine in both classes [7, 68]. In the fungal Ure2p class, the nature of the catalytic residue is difficult to determine from the active site signature but the activity of *Phanerochaete chrysosporium* Ure2pB1 relies on the presence of an asparagine. This residue found at the third position of the catalytic signature (often TPNG) plays a stabilizing role allowing glutathione to efficiently deglutathionylate glutathionyl-phenacylacetophenone [69]. In the fungal-specific GSTFuA family, the serine is replaced by a glycine, an asparagine or an alanine in some isoforms/subclasses which generates some functional diversity [70]. Overall

this shows that GST evolution is complex. Although the separation between Cys-GST and Ser-GST classes is relevant in most cases and useful for the sake of the discussion, this is very often not as clear-cut.

Acknowledgements

This work was supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). The PhD grant of H. Pégeot was co-granted by the latter program and by the Région Lorraine.

References

- 1 Armstrong, R. N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol.* 10, 2-18
- 2 Marrs, K. A. (1996) The Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47, 127-158
- 3 Allocati, N., Federici, L., Masulli, M. and Di Ilio, C. (2009) Glutathione transferases in bacteria. *Febs J.* 276, 58-75
- 4 Jacquot, J. P., Dietz, K. J., Rouhier, N., Meux, E., Lallement, P. A., Selles, B. and Hecker, A. (2013) Redox regulation in plants: Glutathione and “Redoxin” related families. . *Oxidative Stress and Redox Regulation* (Jakob, U. and Reichmann, D., eds), 213–231
- 5 Mashiyama, S. T., Malabanan, M. M., Akiva, E., Bhosle, R., Branch, M. C., Hillerich, B., Jagessar, K., Kim, J., Patskovsky, Y., Seidel, R. D., Stead, M., Toro, R., Vetting, M. W., Almo, S. C., Armstrong, R. N. and Babbitt, P. C. (2014) Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. *PLoS Biol.* 12, e1001843
- 6 Cummins, I., Dixon, D. P., Freitag-Pohl, S., Skipsey, M. and Edwards, R. (2011) Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab Rev.* 43, 266-280
- 7 Lallement, P. A., Brouwer, B., Keech, O., Hecker, A. and Rouhier, N. (2014) The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. *Frontiers in Pharmacology*
- 8 Dixon, D. P., Cole, D. J. and Edwards, R. (2000) Characterisation of a zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism. *Arch Biochem Biophys.* 384, 407-412
- 9 Lallement, P. A., Meux, E., Gualberto, J. M., Prosper, P., Didierjean, C., Saul, F., Haouz, A., Rouhier, N. and Hecker, A. (2014) Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. *Biochem J.* 462, 39-52
- 10 Pégeot, H., Koh, C. S., Petre, B., Mathiot, S., Duplessis, S., Hecker, A., Didierjean, C. and Rouhier, N. (2014) The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1. *Front Plant Sci.* 5, 712
- 11 Dixon, D. P. and Edwards, R. (2010) Glutathione transferases. *Arabidopsis Book.* 8, e0131
- 12 Lan, T., Yang, Z. L., Yang, X., Liu, Y. J., Wang, X. R. and Zeng, Q. Y. (2009) Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family. *Plant Cell.* 21, 3749-3766
- 13 Galle, A., Csiszar, J., Secenji, M., Guoth, A., Cseuz, L., Tari, I., Gyorgyey, J. and Erdei, L. (2009) Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit. *J Plant Physiol.* 166, 1878-1891
- 14 Liu, Y. J., Han, X. M., Ren, L. L., Yang, H. L. and Zeng, Q. Y. (2013) Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants. *Plant Physiol.* 161, 773-786
- 15 Hebel, R., Oeljeklaus, S., Reidegeld, K. A., Eisenacher, M., Stephan, C., Sitek, B., Stuhler, K., Meyer, H. E., Sturre, M. J., Dijkwel, P. P. and Warscheid, B. (2008) Study of early leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by quantitative proteomics using reciprocal ¹⁴N/¹⁵N labeling and difference gel electrophoresis. *Mol Cell Proteomics.* 7, 108-120
- 16 Moons, A. (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitam Horm.* 72, 155-202

- 17 Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D. P. and Mauch, F. (2002) Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol Biol.* 49, 515-532
- 18 Dixon, D. P., Hawkins, T., Hussey, P. J. and Edwards, R. (2009) Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *J Exp Bot.* 60, 1207-1218
- 19 Liu, H. J., Tang, Z. X., Han, X. M., Yang, Z. L., Zhang, F. M., Yang, H. L., Liu, Y. J. and Zeng, Q. Y. (2015) Divergence in Enzymatic Activities in the Soybean GST Supergene Family Provides New Insight into the Evolutionary Dynamics of Whole Genome Duplicates. *Mol Biol Evol*
- 20 McGonigle, B., Keeler, S. J., Lau, S. M., Koeppe, M. K. and O'Keefe, D. P. (2000) A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiol.* 124, 1105-1120
- 21 Sappl, P. G., Carroll, A. J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Harvey Millar, A. and Singh, K. B. (2009) The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J.* 58, 53-68
- 22 Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1, REVIEWS3003
- 23 Cummins, I., O'Hagan, D., Jablonkai, I., Cole, D. J., Hehn, A., Werck-Reichhart, D. and Edwards, R. (2003) Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat. *Plant Mol Biol.* 52, 591-603
- 24 Cummins, I., Wortley, D. J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C. R., Straker, H. E., Sellars, J. D., Knight, K., Edwards, L., Hughes, D., Kaundun, S. S., Hutchings, S. J., Steel, P. G. and Edwards, R. (2013) Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 5812-5817
- 25 Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., Feng, J., Liu, G. and Ren, D. (2011) Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell.* 23, 364-380
- 26 Geu-Flores, F., Moldrup, M. E., Bottcher, C., Olsen, C. E., Scheel, D. and Halkier, B. A. (2011) Cytosolic gamma-glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in Arabidopsis. *Plant Cell.* 23, 2456-2469
- 27 Bilanz, J. and Sturm, A. (1995) Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 109, 253-260
- 28 Gonneau, M., Pagant, S., Brun, F. and Laloue, M. (2001) Photoaffinity labelling with the cytokinin agonist azido-CPPU of a 34 kDa peptide of the intracellular pathogenesis-related protein family in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol Biol.* 46, 539-548
- 29 Sun, Y., Li, H. and Huang, J. R. (2012) Arabidopsis TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts. *Mol Plant.* 5, 387-400
- 30 Dixon, D. P., Sellars, J. D. and Edwards, R. (2011) The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. *Biochem J.* 438, 63-70
- 31 Smith, A. P., Nourizadeh, S. D., Peer, W. A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A. S. and Goldsbrough, P. B. (2003) Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant J.* 36, 433-442
- 32 Alfenito, M. R., Souer, E., Goodman, C. D., Buell, R., Mol, J., Koes, R. and Walbot, V. (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell.* 10, 1135-1149

- 33 Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N. and Ageorges, A. (2011) In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *Plant J.* 67, 960-970
- 34 Kitamura, S., Shikazono, N. and Tanaka, A. (2004) TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant J.* 37, 104-114
- 35 Mueller, L. A., Goodman, C. D., Silady, R. A. and Walbot, V. (2000) AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123, 1561-1570
- 36 Neuefeind, T., Huber, R., Dasenbrock, H., Prade, L. and Bieseler, B. (1997) Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. *J Mol Biol.* 274, 446-453
- 37 Neuefeind, T., Huber, R., Reinemer, P., Knablein, J., Prade, L., Mann, K. and Bieseler, B. (1997) Cloning, sequencing, crystallization and X-ray structure of glutathione S-transferase-III from *Zea mays* var. mutin: a leading enzyme in detoxification of maize herbicides. *J Mol Biol.* 274, 577-587
- 38 Prade, L., Huber, R. and Bieseler, B. (1998) Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase - explanations for the selectivity of the enzyme in plants. *Structure.* 6, 1445-1452
- 39 Reinemer, P., Prade, L., Hof, P., Neuefeind, T., Huber, R., Zettl, R., Palme, K., Schell, J., Koelln, I., Bartunik, H. D. and Bieseler, B. (1996) Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J Mol Biol.* 255, 289-309
- 40 Kabsch, W. (2010) Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 125-132
- 41 Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 62, 72-82
- 42 Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A. and Wilson, K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 67, 235-242
- 43 Vagin, A. and Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 22-25
- 44 Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 213-221
- 45 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 486-501
- 46 Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 12-21
- 47 Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., Jacquot, J. P. and Gelhaye, E. (2013) Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microb Biotechnol.* 6, 248-263
- 48 Armbruster, U., Hertle, A., Makarenko, E., Zuhlke, J., Pribil, M., Dietzmann, A., Schliebner, I., Aseeva, E., Fenino, E., Scharfenberg, M., Voigt, C. and Leister, D. (2009)

Chloroplast proteins without cleavable transit peptides: rare exceptions or a major constituent of the chloroplast proteome? *Mol Plant*. 2, 1325-1335

49 Thatcher, L. F., Carrie, C., Andersson, C. R., Sivasithamparam, K., Whelan, J. and Singh, K. B. (2007) Differential gene expression and subcellular targeting of Arabidopsis glutathione S-transferase F8 is achieved through alternative transcription start sites. *J Biol Chem*. 282, 28915-28928

50 Rouhier, N. and Jacquot, J. P. (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 38, 1413-1421

51 Gama, F., Brehelin, C., Gelhaye, E., Meyer, Y., Jacquot, J. P., Rey, P. and Rouhier, N. (2008) Functional analysis and expression characteristics of chloroplastic Prx IIE. *Physiol Plant*. 133, 599-610

52 Gama, F., Keech, O., Eymery, F., Finkemeier, I., Gelhaye, E., Gardeström, P., Dietz, K.-J., Rey, P., Jacquot, J.-P. and Rouhier, N. (2007) The mitochondrial type II peroxiredoxin from poplar. *Physiologia Plantarum*. 129, 196-206

53 Rouhier, N., Gelhaye, E., Gualberto, J. M., Jordy, M. N., De Fay, E., Hirasawa, M., Duplessis, S., Lemaire, S. D., Frey, P., Martin, F., Manieri, W., Knaff, D. B. and Jacquot, J. P. (2004) Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Physiol*. 134, 1027-1038

54 Selles, B., Hugo, M., Trujillo, M., Srivastava, V., Wingsle, G., Jacquot, J. P., Radi, R. and Rouhier, N. (2012) Hydroperoxide and peroxynitrite reductase activity of poplar thioredoxin-dependent glutathione peroxidase 5: kinetics, catalytic mechanism and oxidative inactivation. *Biochem J*. 442, 369-380

55 Couturier, J., Jacquot, J. P. and Rouhier, N. (2013) Toward a refined classification of class I dithiol glutaredoxins from poplar: biochemical basis for the definition of two subclasses. *Front Plant Sci*. 4, 518

56 Lallement, P. A., Meux, E., Gualberto, J. M., Dumarcay, S., Favier, F., Didierjean, C., Saul, F., Haouz, A., Morel-Rouhier, M., Gelhaye, E., Rouhier, N. and Hecker, A. (2015) Glutathionyl-hydroquinone reductases from poplar are plastidial proteins that deglutathionylate both reduced and oxidized glutathionylated quinones. *FEBS Lett*. 589, 37-44

57 Kiefer, P. M., Jr. and Copley, S. D. (2002) Characterization of the initial steps in the reductive dehalogenation catalyzed by tetrachlorohydroquinone dehalogenase. *Biochemistry*. 41, 1315-1322

58 Caccuri, A. M., Antonini, G., Allocati, N., Di Ilio, C., De Maria, F., Innocenti, F., Parker, M. W., Masulli, M., Lo Bello, M., Turella, P., Federici, G. and Ricci, G. (2002) GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*: a snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme. *J Biol Chem*. 277, 18777-18784

59 Casalone, E., Allocati, N., Ceccarelli, I., Masulli, M., Rossjohn, J., Parker, M. W. and Di Ilio, C. (1998) Site-directed mutagenesis of the *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1 G-site. *FEBS Lett*. 423, 122-124

60 Kortemme, T. and Creighton, T. E. (1995) Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family. *J Mol Biol*. 253, 799-812

61 Mossner, E., Huber-Wunderlich, M. and Glockshuber, R. (1998) Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci*. 7, 1233-1244

62 Ren, G., Stephan, D., Xu, Z., Zheng, Y., Tang, D., Harrison, R. S., Kurz, M., Jarrott, R., Shouldice, S. R., Hiniker, A., Martin, J. L., Heras, B. and Bardwell, J. C. (2009) Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J Biol Chem*. 284, 10150-10159

- 63 Dyson, H. J., Jeng, M. F., Tennant, L. L., Slaby, I., Lindell, M., Cui, D. S., Kuprin, S. and Holmgren, A. (1997) Effects of buried charged groups on cysteine thiol ionization and reactivity in *Escherichia coli* thioredoxin: structural and functional characterization of mutants of Asp 26 and Lys 57. *Biochemistry*. 36, 2622-2636
- 64 Frova, C. (2006) Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol Eng*. 23, 149-169
- 65 Winayanuwattikun, P. and Ketterman, A. J. (2005) An electron-sharing network involved in the catalytic mechanism is functionally conserved in different glutathione transferase classes. *J Biol Chem*. 280, 31776-31782
- 66 Thom, R., Dixon, D. P., Edwards, R., Cole, D. J. and Laphorn, A. J. (2001) The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. *J Mol Biol*. 308, 949-962
- 67 Board, P. G., Taylor, M. C., Coggan, M., Parker, M. W., Lantum, H. B. and Anders, M. W. (2003) Clarification of the role of key active site residues of glutathione transferase zeta/maleylacetoacetate isomerase by a new spectrophotometric technique. *Biochem J*. 374, 731-737
- 68 Morel, M., Ngadin, A. A., Droux, M., Jacquot, J. P. and Gelhaye, E. (2009) The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Cell Mol Life Sci*. 66, 3711-3725
- 69 Thuillier, A., Roret, T., Favier, F., Gelhaye, E., Jacquot, J. P., Didierjean, C. and Morel-Rouhier, M. (2013) Atypical features of a Ure2p glutathione transferase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett*. 587, 2125-2130
- 70 Mathieu, Y., Prosper, P., Favier, F., Harvengt, L., Didierjean, C., Jacquot, J. P., Morel-Rouhier, M. and Gelhaye, E. (2013) Diversification of fungal specific class a glutathione transferases in saprotrophic fungi. *PLoS One*. 8, e80298
- 71 Engh, R. A. and Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta crystallographica. Section A*. A47, 392-400

Figure legends

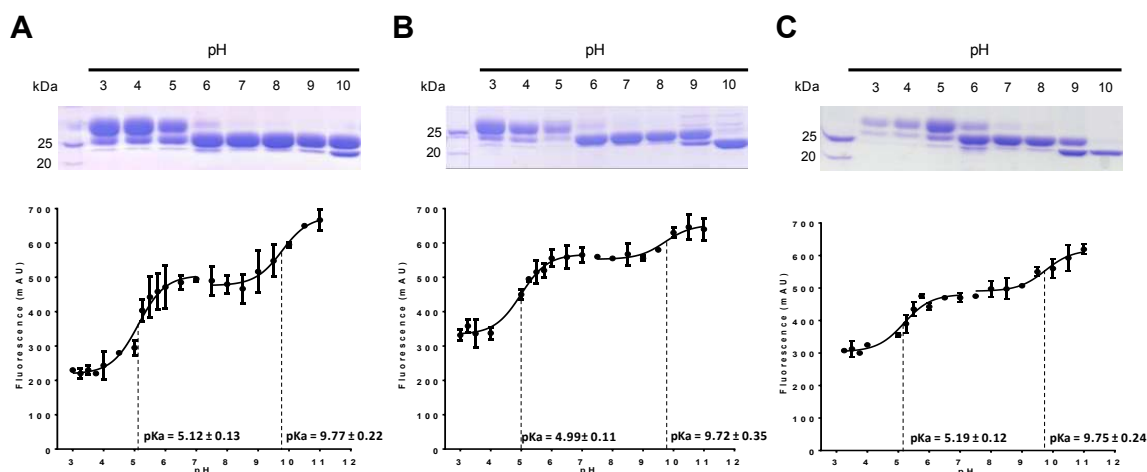


Figure 1: pKa determination of the cysteines in Cys-containing GSTFs

Pre-reduced GSTF3 (A), F7 (B) and F8 (C) were incubated with iodoacetamide in buffers ranging from pH 2.0 to 10.0 prior to alkylation with mPEG-2000 and SDS-PAGE analysis (upper panels). Alternatively, they were incubated with fluorescein-iodoacetamide in buffers ranging from pH 3.0 to 11.0. The pKa values were determined by plotting fluorescence intensity as a function of pH and using a sigmoidal dose-response standard curve model (lower panels).

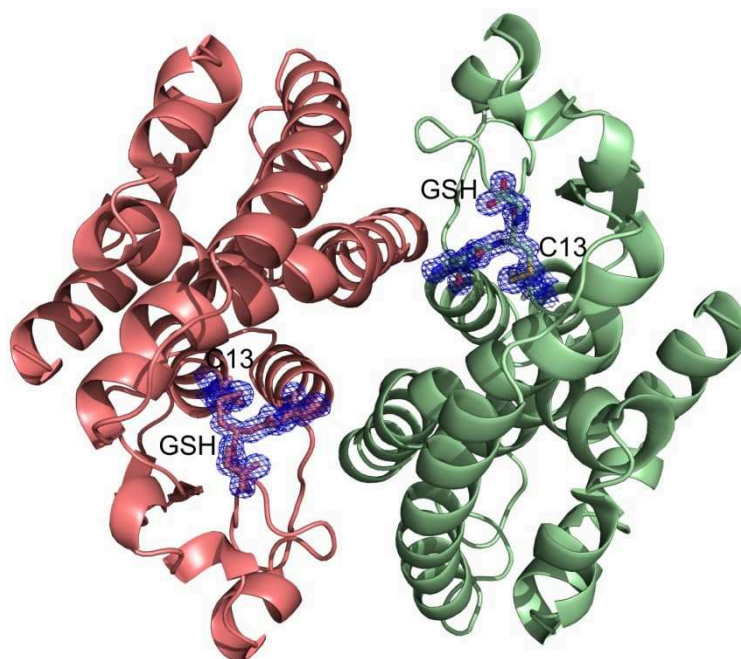


Figure 2. Architecture of GSTF8 dimer

The glutathione molecule covalently bound to C13 is shown in both monomers. Monomers A and B are coloured in red and green, respectively. The glutathione molecule and C13 residue are depicted as sticks. 2mFo-DFc electron density map (coloured in blue) of contour level pf 1.2 σ is shown around glutathione molecules and C13A and C13B residues.

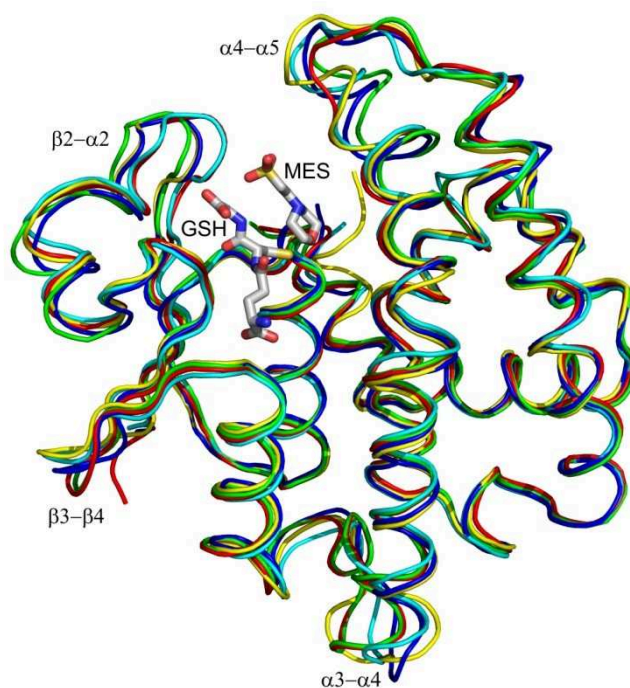


Figure 3. Superimposition of GSTF monomers

GSTF2, F5, F7 and F8 monomers are represented in cartoon style and coloured in greyscale. They were all superimposed on GSTF1 monomer coloured in black. Glutathione and MES molecules, bound in GSTF1, highlight the G- and H-sites of GSTs.

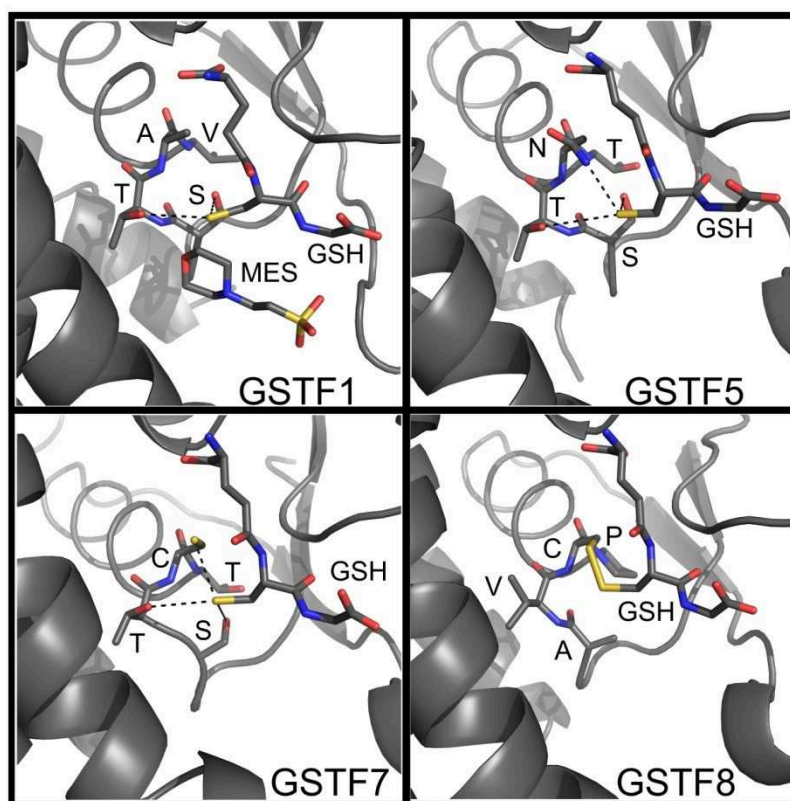


Figure 4. Environment of the GSH sulfur atom in GSTFs

A GSH molecule was found in the crystal structures of GSTF1, F5, F7 and F8. The GSH molecules, the MES molecule (in GSTF1 structure) and the residues of the active site motifs are shown as sticks and coloured according to atom type (nitrogen, blue ; oxygen, red ; sulfur, yellow ; and carbon, gray). The active site motifs are labelled.

	Protein concentration (mg/ml)	Volume (μl)	Condition	Precipitant	Buffer (0.1 M)	Additive	Cryo additive
GSTF2	13.2	1.5/2	JBS1 ¹ D4	30% PEG MME ² 2000	Na MES ³ pH6.5	0.1 M Na acetate	20% glycerol
GSTF5	16.6	1/1	JBS3 B3	30% PEG ⁴ 4000	Tris ⁵ HCl pH8.5	0.2 M Mg chloride	20% glycerol
GSTF7	19.0	1.5/2	JBS2 D5	16% PEG 4000, 10% 2-propanol	Na Hepes ⁶ pH 7.5	0.2 AS ⁶	-
GSTF8	13.7	1/1	JBS2 C3	25% PEG 4000	Na MES pH6.5	0.2 M Mg chloride	20% glycerol

Table 1. Summary of GSTF crystallization conditions.

In each case, the concentration of protein and the mixing ratio between the protein and the precipitant solutions (in the volume column) are indicated. Crystals were briefly soaked in precipitant solution supplemented with glycerol before flash cooling in all cases but GSTF7. (1) Classic-crystallization kit from Jena Bioscience GmbH, Germany (2) Polyethylene glycol monomethyl ether ; (3) 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid ; (4) Polyethylene glycol ; (5) 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol ; (6) 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid.

<i>Data collection</i>	GSTF2	GSTF5	GSTF7	GSTF8
Beam line	FIP-BM30A	FIP-BM30A	FIP-BM30A	FIP-BM30A
Space group	<i>P</i> ₂ ₁ ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁ ₂ ₁	<i>C</i> ₂
Unit cell				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	96.4 83.3 60.1	54.4 85.9 88.5	54.1 90.4 97.2	90.0 55.3 55
β (°)	90	97.9	90	119.9
Resolution (Å)	48.7-1.9 (2.0-1.9)	49.0-1.7 (1.8-1.7)	48.6-1.7 (1.8-1.7)	47.7-1.5 (1.6-1.5)
Unique reflections	38,738 (5,545)	88,400 (12,529)	50,544 (7,252)	37,437 (5,355)
Average multiplicity	7.3 (7.4)	3.8 (3.7)	7.3 (7.3)	3.6 (3.4)
Completeness (%)	99.8 (99.4)	99.6 (92.0)	100.0 (100.0)	99.6 (98.4)
Rmerge¹	0.064 (0.475)	0.102 (0.565)	0.103 (0.664)	0.045 (0.292)
Mean I/σ	22.9 (4.3)	11.0 (3.0)	13.1 (2.9)	32.2 (3.5)
Refinement				
Resolution (Å)	48.7-1.9 (1.95-1.90)	43.4-1.7 (1.72-1.70)	48.6-1.8 (2.4)	39.0-1.5 (1.54-1.50)
<i>R</i>work²	0.199(0.251)	0.148(0.226)	0.181(0.205)	0.161(0.214)
<i>R</i>free³	0.228(0.303)	0.170(0.265)	0.210(0.235)	0.161(0.247)
Total number of atoms	7,339	2,223	7,734	3,867
Water	400	875	763	322
Ligands	-	4 GSH ; 2 12P, 1 PGE, 1 PG4, 4 GOL, 2 Mg	2 GSH ; 1 SO4	1 GSH
<i>R.m.s deviations</i>⁴				
Bonds	0.006	0.004	0.003	0.007
Angles	0.977	0.801	0.817	1.096
<i>MolProbity analysis</i>⁵				
Clashscore, all atoms	1.02	0.81	2.13	3.88
MolProbity score	0.82	0.75	1.43	2.87
PDB Entry	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX

Table 2. Crystallographic statistics.

Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

(1) $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i \langle I(hkl) \rangle$.

(2) $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$, *Rwork* was calculated for the working set (95% of the data).

(3) 5% of the reflections were selected for free *R* calculation.

(4) Root-mean-square deviation from ideal values [71].

(5) The MolProbity clashscore is the number of serious clashes per 1000 atoms. The MolProbity score is a log-weighted combination of the clashscore, percentage Ramachandran not favoured and percentage bad side-chain rotamers [46].

Protein	Theoretical molecular mass (Da)	Measured molecular mass (Da)	Difference (Da)	Apparent molecular mass (Da)	Retention on GSH sepharose	Observed free thiols (theoretical)
GSTF1 ¹	24320.7	24192.0	- 128.7 (- Met)	47600	yes	2.13 ± 0.11 (2)
GSTF2	24618.9	24487.2	- 131.7 (- Met)	56000	yes	1.84 ± 0.03 (2)
GSTF3	24612.3	24784.9	+172.6 (- Met + GSH)	52200	no	1.05 ± 0.09 (2)
GSTF4	23755.5	23624.5	- 131.0 (- Met)	60300	yes	1.88 ± 0.02 (2)
GSTF5	23196.4	23065.1	- 131.3 (- Met)	47800	partially	nd (0)
GSTF6	23212.4	23079.8	- 132.6 (- Met)	47200	partially	nd (0)
GSTF7	24597.2	24771.9	+174.7 (- Met + GSH)	52700	no	0.97 ± 0.01 (2)
GSTF8	24441.1	24614.3	+173.2 (- Met + GSH)	51300	no	1.09 ± 0.04 (2)

Table 3. Analysis of the redox and oligomerization states of poplar GSTFs.

As-purified recombinant proteins have been analyzed by mass spectrometry and by analytical gel filtration experiments on a S200 10/300 column connected to an Akta purifier system (GE Healthcare). The ability of as-purified proteins to bind on GSH sepharose and the number of free thiol groups, if any cysteine present, was also assayed. nd stands for not determined. ¹Results for GSTF1 are from [10].

	CDNB	PNP-butyrat	PITC	BITC	CuOOH	DHA	HED
K_m (μM)							
GSTF1 (STAV)*	3065.6 ± 286.5	360.3 ± 32.2	148.8 ± 5.9	380.6 ± 43.7	592.1 ± 51.6	ND	ND
GSTF2 (STAV)	2263.4 ± 182.8	946.3 ± 108.2	379.2 ± 35.5	312.0 ± 22.7	4063.5 ± 332.4	ND	ND
GSTF3 (STCT)	1264.0 ± 88.7	383.5 ± 45.7	297.5 ± 33.6	85.3 ± 8.6	359.7 ± 30.4	5252.3 ± 338.9	706.6 ± 46.0
GSTF4 (STAT)	1059.1 ± 47.1	406.4 ± 45.8	264.5 ± 34.0	347.1 ± 47.3	2585.0 ± 255.4	ND	ND
GSTF5 (STNT)	2667.1 ± 155.5	333.4 ± 33.2	ND	177.1 ± 7.9	ND	ND	ND
GSTF6 (STNT)	1094.9 ± 76.1	850.0 ± 80.7	ND	437.2 ± 47.3	ND	ND	ND
GSTF7 (STCT)	1271.3 ± 64.9	177.5 ± 17.7	125.9 ± 17.5	46.0 ± 6.8	87.4 ± 8.1	3699.1 ± 262.7	738.2 ± 54.9
GSTF8 (AVCP)	726.5 ± 44.3	594.4 ± 71.4	ND	ND	ND	ND	565.0 ± 45.8
k_{cat} (s⁻¹)							
GSTF1 (STAV)*	4.20 ± 0.18	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.70 ± 0.03	1.92 ± 0.04	ND	ND
GSTF2 (STAV)	3.98 ± 0.15	0.32 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.44 ± 0.02	0.83 ± 0.028	ND	ND
GSTF3 (STCT)	0.81 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.55 ± 0.03	0.81 ± 0.03	1.88 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.84 ± 0.02
GSTF4 (STAT)	1.95 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.061 ± 0.003	0.57 ± 0.03	0.60 ± 0.02	ND	ND
GSTF5 (STNT)	1.67 ± 0.04	0.013 ± 0.005	ND	0.097 ± 0.002	ND	ND	ND
GSTF6 (STNT)	1.35 ± 0.03	0.023 ± 0.001	ND	0.14 ± 0.01	ND	ND	ND
GSTF7 (STCT)	0.45 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.102 ± 0.003
GSTF8 (AVCP)	0.14 ± 0.01	0.83 ± 0.05	ND	ND	ND	ND	0.051 ± 0.001
k_{cat}/K_m (M⁻¹.s⁻¹)							
GSTF1 (STAV)*	1370.0 ± 3.6	661.9 ± 17.3	1410.3 ± 19.0	1839.2 ± 87.2	3245.7 ± 76.9	ND	ND
GSTF2 (STAV)	1758.3 ± 65.5	335.6 ± 20.8	359.1 ± 17.2	1432.3 ± 58.7	205.7 ± 7.0	ND	ND
GSTF3 (STCT)	640.3 ± 18.2	181.5 ± 9.1	1840.2 ± 91.5	9524.8 ± 142.7	5240.0 ± 112.8	187.5 ± 8.0	1192.0 ± 27.2
GSTF4 (STAT)	1840.1 ± 24.7	342.0 ± 15.3	230.8 ± 12.8	1640.0 ± 100.7	232.0 ± 8.5	ND	ND
GSTF5 (STNT)	626.1 ± 15.1	39.7 ± 1.3	ND	548.5 ± 9.8	ND	ND	ND
GSTF6 (STNT)	1231.8 ± 27.5	27.3 ± 1.3	ND	326.3 ± 14.7	ND	ND	ND
GSTF7 (STCT)	352.5 ± 7.3	925.7 ± 35.2	2220.1 ± 88.3	14670.3 ± 545.5	5167.1 ± 135.5	82.3 ± 3.2	138.7 ± 3.7
GSTF8 (AVCP)	199.2 ± 3.3	1396.2 ± 78.0	ND	ND	ND	ND	90.8 ± 2.2

Table 4. Steady-state kinetic parameters of poplar GSTFs toward model substrates.

The catalytic constants have been determined by varying substrate concentrations at a fixed saturating GSH concentration and calculated with a Michaelis-Menten non-linear regression model using GraphPad Prism 6 software. Results are means $\pm$ S.D (n=3). ND stands for not detected. Tested substrates are: BITC, benzyl isothiocyanate; PITC, phenethyl isothiocyanate; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; PNP-butyrate, 4-nitrophenyl butyrate; CuOOH, cumene hydroperoxide; DHA, dehydroascorbic acid; HED, hydroxyethyl disulfide. The active site signature of each enzyme is indicated in bracket. *Kinetic parameters of GSTF1 are indicated for comparison [10].

	$K_{M,GSH} (\mu M)$
GSTF1	51.0 ± 3.6
GSTF2	135.6 ± 20.9
GSTF3	154.1 ± 14.5
GSTF3 S11A	2011.8 ± 160.7
GSTF3 C13A	18.2 ± 2.6
GSTF3 S11A/C13A	71.4 ± 6.0
GSTF4	13.7 ± 1.1
GSTF5	5.5 ± 0.6
GSTF6	19.7 ± 2.4
GSTF7	48.2 ± 3.4
GSTF7 S11A	471.7 ± 59.0
GSTF7 C13A	18.0 ± 1.1
GSTF7 S11A/C13A	94.7 ± 6.4
GSTF8	645.9 ± 51.1
GSTF8 A11S	ND
GSTF8 C13A	ND
GSTF8 C13S	12.5 ± 1.1

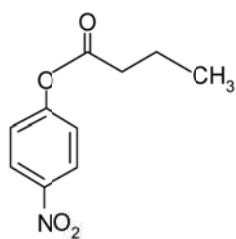
Table 5. Apparent affinity of GSTF and related variants for GSH.

The catalytic parameters for GSH have been determined by varying GSH concentrations from 10 to 3000 μM using CDNB as a second substrate at the saturating concentration of 5 mM. The apparent K_M values of GSTF8 A11S and GSTF8 C13A for GSH could not be determined because they are not active in this assay.

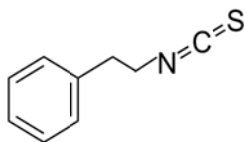
		CDNB	PNP-butyrate	PITC	BITC	CuOOH	DHA	HED
K_m (μM)	GSTF3 (STCT)	1264.0 ± 88.7	383.5 ± 45.7	297.4 ± 33.5	85.2 ± 8.6	359.7 ± 30.4	5252.3 ± 338.9	706.6 ± 46.0
	GSTF3 S11A (ATCT)	1079.4 ± 122.6	455.8 ± 40.2	ND	ND	492.5 ± 33.5	830.7 ± 58.9	241.8 ± 17.7
	GSTF3 C13A (STAT)	1472.2 ± 88.5	322.1 ± 33.2	341.6 ± 30.2	99.8 ± 8.1	316.6 ± 24.6	ND	ND
	GSTF3 S11A, C13A (ATAT)	938.3 ± 68.4	436.7 ± 24.0	ND	ND	103.1 ± 7.8	ND	ND
	GSTF7 (STCT)	1271.3 ± 64.9	177.5 ± 17.7	125.8 ± 17.4	46.0 ± 6.8	87.4 ± 8.1	3699.1 ± 262.7	738.3 ± 54.9
	GSTF7 S11A (ATCT)	608.1 ± 46.4	259.6 ± 45.1	ND	ND	131.0 ± 7.1	1145.6 ± 62.8	397.1 ± 23.2
	GSTF7 C13A (STAT)	1000.6 ± 102.4	562.0 ± 44.5	163.1 ± 17.2	158.0 ± 6.8	63.8 ± 3.5	ND	ND
	GSTF7 S11A, C13A (ATAT)	1089.4 ± 27.9	359.6 ± 34.0	ND	ND	443.8 ± 34.0	ND	ND
	GSTF8 (AVCP)	726.5 ± 44.31	594.4 ± 71.5	ND	ND	ND	ND	565.1 ± 45.8
	GSTF8 C13S (AVSP)	1821.9 ± 139.4	393.9 ± 31.7	241.6 ± 15.9	112.6 ± 7.0	ND	ND	ND
k_{cat} (s⁻¹)	GSTF3 (STCT)	0.81 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.55 ± 0.03	0.81 ± 0.03	1.88 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.84 ± 0.02
	GSTF3 S11A (ATCT)	0.12 ± 0.01	0.063 ± 0.002	ND	ND	1.80 ± 0.04	1.71 ± 0.04	2.56 ± 0.04
	GSTF3 C13A (STAT)	0.70 ± 0.01	0.192 ± 0.005	1.10 ± 0.05	0.78 ± 0.02	1.33 ± 0.02	ND	ND
	GSTF3 S11A, C13A (ATAT)	0.88 ± 0.02	0.090 ± 0.002	ND	ND	0.90 ± 0.01	ND	ND
	GSTF7 (STCT)	0.45 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.102 ± 0.003
	GSTF7 S11A (ATCT)	0.133 ± 0.001	0.115 ± 0.005	ND	ND	1.54 ± 0.02	1.09 ± 0.02	1.07 ± 0.02
	GSTF7 C13A (STAT)	0.61 ± 0.02	0.22 ± 0.01	1.50 ± 0.05	0.49 ± 0.01	0.58 ± 0.01	ND	ND
	GSTF7 S11A, C13A (ATAT)	0.60 ± 0.01	0.123 ± 0.003	ND	ND	1.65 ± 0.05	ND	ND
	GSTF8 (AVCP)	0.145 ± 0.002	0.83 ± 0.05	ND	ND	ND	ND	0.051 ± 0.001
	GSTF8 C13S (AVSP)	0.29 ± 0.01	0.107 ± 0.002	4.03 ± 0.12	16.78 ± 0.36	ND	ND	ND
k_{cat}/K_m (M⁻¹.s⁻¹)	GSTF3 (STCT)	640.3 ± 18.2	181.5 ± 9.1	1840.2 ± 91.5	9524.8 ± 142.7	5240 ± 112.8	187.5 ± 8.0	1192.0 ± 27.2
	GSTF3 S11A (ATCT)	111.6 ± 6.6	138.3 ± 5.1	ND	ND	3651.7 ± 98.3	2061.7 ± 46.7	10581.7 ± 158.3
	GSTF3 C13A (STAT)	473.3 ± 10.0	593.3 ± 16.7	3206.7 ± 143.3	7821.0 ± 199.3	4195.0 ± 86.7	ND	ND
	GSTF3 S11A, C13A (ATAT)	935.1 ± 25.0	205.0 ± 3.3	ND	ND	8345.1 ± 116.7	ND	ND
	GSTF7 (STCT)	352.5 ± 7.3	925.7 ± 35.2	2220.1 ± 88.3	14670.3 ± 545.5	5167.1 ± 135.5	82.3 ± 3.2	138.7 ± 3.7
	GSTF7 S11A (ATCT)	220.0 ± 6.7	445.0 ± 21.7	ND	ND	11793.3 ± 136.7	948.3 ± 18.3	2696.7 ± 50.5
	GSTF7 C13A (STAT)	613.3 ± 20.1	401.0 ± 11.7	1503.3 ± 58.3	3125.7 ± 55.3	9105.4 ± 85.0	ND	ND
	GSTF7 S11A, C13A (ATAT)	551.5 ± 5.8	342.7 ± 8.3	ND	ND	3708.8 ± 109.5	ND	ND
	GSTF8 (AVCP)	199.2 ± 3.3	1396.2 ± 78.0	ND	ND	ND	ND	90.8 ± 2.2
	GSTF8 C13S (AVSP)	159.7 ± 5.2	271.0 ± 6.17	21026.7 ± 606.7	149003.7 ± 3190.7	ND	ND	ND

Table 6. Steady-state kinetic parameters of catalytic variants of poplar Cys-GSTFs towards model substrates.

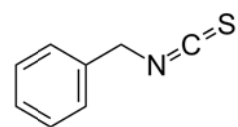
The catalytic constants have been determined by varying substrate concentrations at a fixed saturating GSH concentration and calculated with a Michaelis-Menten non-linear regression model using GraphPad Prism 6 software. Results are means ± S.D (n=3). ND stands for not detected. Tested substrates are the same as those presented in Table 4.



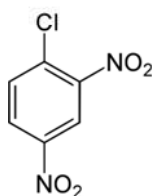
4-nitrophenyl butyrate
(PNP-butyrate)



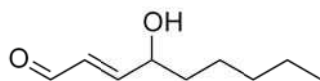
benzyl isothiocyanate
(BITC)



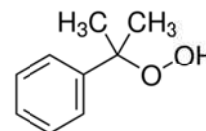
phenethyl isothiocyanate
(BITC)



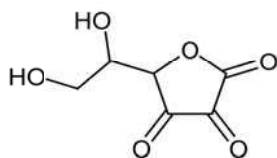
1-chloro-2,4-dinitrobenzene
(CDNB)



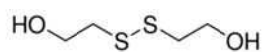
4-hydroxy-2-nonenal
(HNE)



cumene hydroperoxide
(CuOOH)



dehydroascorbic acid
(DHA)



hydroxyethyl disulfide
(HED)

Figure S1: Chemical compounds used in the present study

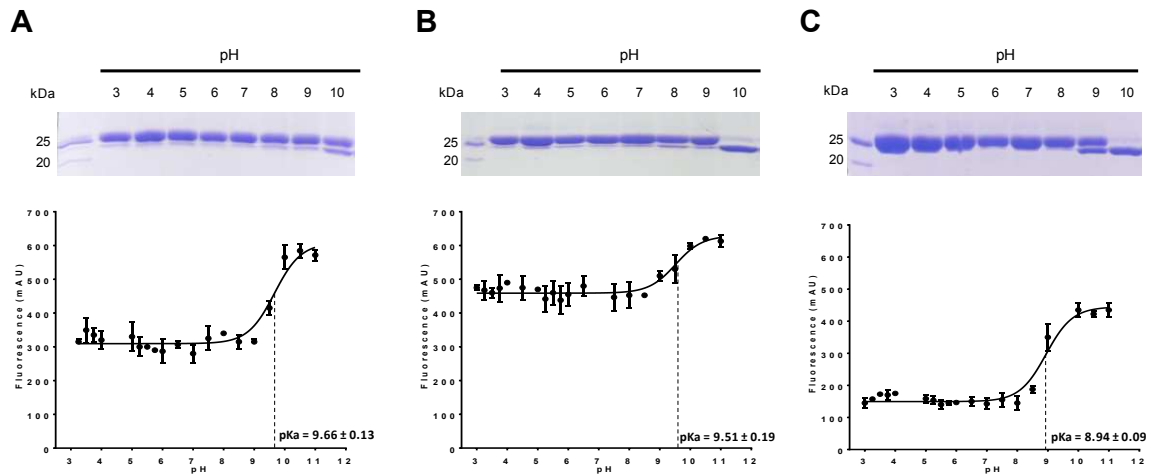


Figure S2: pKa determination of the cysteines in Cys-containing GSTFs C13A variants.

GSTF3 (A), F7 (B) and F8 (C) C13A variants were incubated with iodoacetamide in buffers ranging from pH 2.0 to 10.0 prior to alkylation with mPEG-2000 and SDS-PAGE analysis (upper panels). Alternatively, they were incubated with fluorescein-iodoacetamide in buffers ranging from pH 3.0 to 11.0. The pKa values were determined by plotting fluorescence intensity as a function of pH and using a sigmoidal dose-response standard curve model (lower panels).

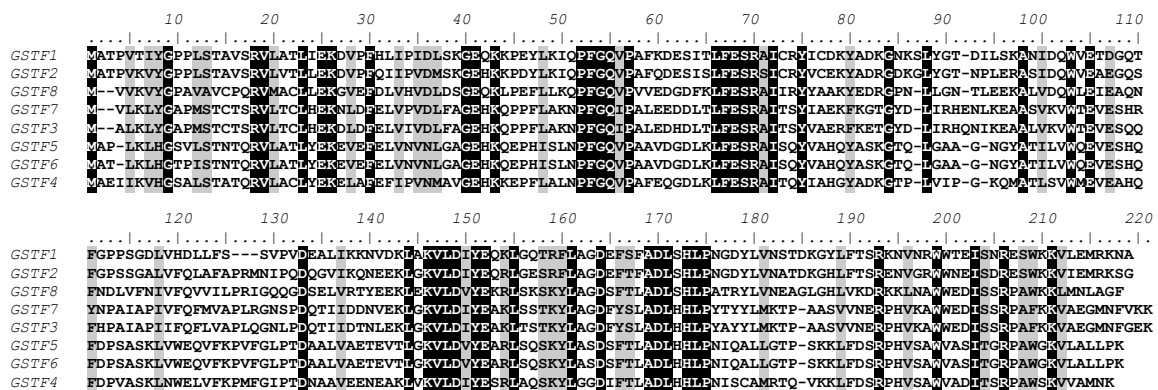


Figure S3: Alignment of *Populus trichocarpa* GSTF amino acids sequences.

7. Chapitre 3 : Vers l'identification et la caractérisation des substrats des glutathion transférases de la classe Phi du peuplier *Populus trichocarpa*

7.1. Matériels et méthodes relatifs au chapitre 3

7.1.1. Collecte et préparation du matériel végétal

Différents organes de peuplier (feuilles, bourgeons, fleurs mâles et femelles) ont été collectés à partir de deux peupliers adultes mâle et femelle (*Populus trichocarpa*) situés sur le campus universitaire de Vandoeuvre-lès-Nancy. Les échantillons ont été séchés à l'air libre et à l'obscurité pendant trois à quatre jours. Ils ont été ensuite broyés à l'azote liquide dans un mortier et la poudre obtenue a été conservée à -80°C. L'extraction des métabolites secondaires a été effectuée à partir de cette poudre par deux méthodes, la première par le biais d'un extracteur de Soxhlet et la seconde par macération directe dans un mélange méthanol/eau.

7.1.2. Extraction des métabolites secondaires à l'aide d'un extracteur de Soxhlet

L'appareil de Soxhlet est composé d'un ballon en verre surmonté d'un tube dans lequel est placée une cartouche poreuse de cellulose contenant la poudre à extraire, d'un tube siphon et d'un tube d'adduction, le tout étant surmonté d'un tube réfrigérant. Le solvant, dont la polarité est variable, est alors placé dans le ballon puis chauffé jusqu'à ébullition. Une fois condensé au niveau du réfrigérant, le solvant est recueilli dans le réservoir qui contient la cartouche poreuse de poudre à extraire permettant la macération. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, provoquant alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. A chaque cycle d'extraction, le solvant contenu dans le ballon est enrichi progressivement en composés solubles.

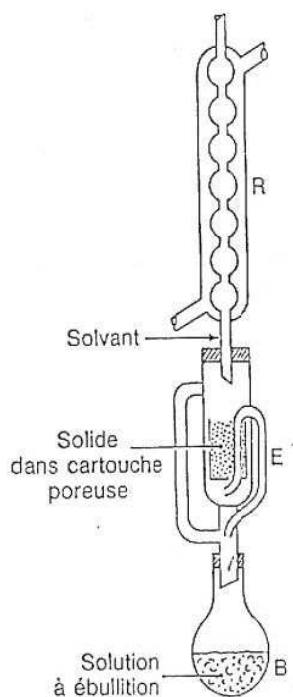


Figure 42 : Représentation schématique du fonctionnement de l'appareil de Soxhlet. **B** : Ballon contenant le solvant. **E** : Colonne d'extraction composée du réservoir et du tube-siphon. **R** : Réfrigérant.

Les extractions de métabolites ont été réalisées à partir de 10 g de poudre d'extract et de 150 mL de solvants de polarité croissante (dichlorométhane, acétone, toluène/éthanol (2/1, v/v), eau) pendant 16 heures. Après extraction au dichlorométhane, à l'acétone ou au toluène/éthanol, l'élimination du solvant d'extraction a été réalisée sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Dans le cas des extractions aqueuses, les échantillons ont été lyophilisés. Les résidus alors obtenus ont été pesés puis dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). La concentration massique ainsi que le rendement de chaque extraction ont été déterminés à l'aide de la formule suivante :

$$Rdt (\%) = \frac{\text{Masse obtenue après extraction}}{\text{Masse de poudre extraite}} \times 100$$

1.1.1. Extraction méthanolique de métabolites secondaires

La poudre végétale a été suspendue dans un mélange méthanol/eau 4/1 (v/v) puis incubée 20 minutes à température ambiante. La suspension méthanolique a ensuite été centrifugée à 3000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et le culot repris dans un même mélange méthanol/eau. Cette étape a été répétée successivement trois fois. Les différents surnageants obtenus ont été évaporés pendant une nuit à l'aide d'un appareil de type SpeedVac™ (UniEquip). Après évaporation, les extraits ont été pesés puis les différents extraits de surnageants évaporés sont regroupés et resuspendus dans du DMSO. La

concentration massique des échantillons ainsi que le rendement d'extraction sont déterminés comme précédemment.

7.1.4. *Fractionnement d'extraits par chromatographie haute performance*

L'extrait aqueux de fleurs femelles a subi un fractionnement par chromatographie liquide haute performance (HPLC). 60 µL d'extrait à 10 mg/mL ont été séparés à l'aide d'une colonne analytique Kinetex biphenyl (250 x 4,6 mm, chromatographie en phase inverse) préalablement équilibrée avec un tampon eau/acide formique 0,1%. Les molécules adsorbées à la colonne ont alors été éluées à l'aide d'un gradient linéaire de méthanol (0 à 100%) sur une durée de 45 minutes. Les différentes fractions collectées ont ensuite été évaporées au SpeedVac™ (UniEquip) puis dissoutes dans 60 µL de DMSO.

7.1.5. *Analyses des extraits par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)*

Préalablement à l'analyse en GC/MS, 1 à 3 mg d'extraits ont été traités par 50 à 100 µL de N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA, agent de silylation) pendant au moins 6 heures à 70°C. Cette étape a pour but de transformer les groupements hydroxyles des composés chimiques en groupements triméthylsilyles et ainsi de stabiliser et de faciliter la détection des molécules chimiques. Une fois le BSTFA évaporé, les extraits silylés ont été dissous dans 1 mL d'acétate d'éthyle puis analysés (1 µL) par l'intermédiaire d'un injecteur chauffé à 250°C. La séparation a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CLARUS 680 Gas Chromatography, Perkin Elmer) à l'aide d'une phase stationnaire de type DB-5MS (longueur : 30 m ; diamètre : 250 µm ; épaisseur du film : 0,25 µm). Au cours de la séparation, l'ensemble a été chauffé 10 min à 80°C, 15 min à 190°C, 10 min à 280°C et enfin 5 min à 300°C. Les molécules, entraînées par une phase mobile d'hélium à un débit de 1 mL/min, ont alors été analysées par spectrométrie de masse (Clarus SQ8T Mass Spectrometer, Perkin Elmer).

7.1.6. Etude de l'interaction protéines-ligands/substrats par analyse de la thermostabilité des protéines

La mesure de la fluorescence par déplacement thermique a été réalisée à partir des versions recombinantes des GSTFs de peuplier. Les expériences ont été menées dans un volume final de 25 μ L en présence de Tris-HCl 30 mM pH 8,0, de Sypro® Orange (Sigma-Aldrich) à 5X, de 10 à 40 μ M de GSTFs et 0,8 mg/mL d'extraits. Les mélanges réactionnels ont été soumis à un chauffage de 5°C à 95°C avec une augmentation de 1°C/min. L'émission de fluorescence a été enregistrée à l'aide d'un appareil de PCR en temps réel (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad). Après avoir soustrait le bruit de fond (fluorescence due au marqueur fluorescent seul), les valeurs de fluorescence obtenues pour chaque essai ont été normalisées. La valeur du point d'inflexion de la courbe obtenue, valeur correspondant à la température de dénaturation de la protéine, a été déterminée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 paramétré selon le modèle sigmoïdal de Boltzmann. Pour chaque essai, la température de fusion ainsi déterminée a été comparée à la température de fusion de la protéine étudiée incubée en absence de molécule ou d'extrait.

7.1.7. Etude de l'interaction protéines-ligands/substrats par compétition enzymatique

7.1.7.1. Analyse de l'activité estérase

L'activité estérase de la GSTF1 a été mesurée envers le 4-méthylumbelliféryl acétate (4-MOA) qui est hydrolysé en présence d'une estérase en eau et 4-méthylumbelliférone, composé chimique dont la formation peut être suivie par spectrofluorimétrie à 460 nm après excitation à 355 nm. La réaction enzymatique s'est déroulée dans un volume de 500 μ L de tampon Tris-HCl 30 mM pH 8,0, EDTA 1 mM ; en présence selon le cas de concentrations variables de 4-MOA (50 à 750 μ M) et de GSH 1 mM. Après incubation des substrats, la réaction a été déclenchée par l'ajout de 1 μ M de protéines recombinantes. Les paramètres cinétiques de la réaction, constante de Michaelis-Menten apparente (K_m) et nombre de cycle catalytique (k_{cat}), ont été déterminés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 selon le modèle non-linéaire de Michaelis-Menten en prenant en compte pour chaque essai trois expériences indépendantes. Pour chaque expérience, l'activité non enzymatique (en absence d'enzyme) a été retranchée et seule l'activité initiale de la réaction a été prise en compte.

7.1.7.2. Tests d'inhibitions compétitives à l'aide de la 4-méthylumbelliféryl acétate

Les tests d'inhibition par compétition ont été réalisés par mesure de l'activité estérase en présence de 4-MOA et d'inhibiteurs. La réaction enzymatique a été réalisée en deux étapes successives. En premier lieu, l'enzyme (0,1 μM) a été pré-incubée dans un volume de tampon Tris-HCl 30 mM pH 8,0, EDTA 1 mM supplémenté par 500 μM de GSH et 500 μM de 4-MOA permettant d'atteindre 200 μL après l'ajout de molécules inhibitrices. L'émission de fluorescence basale est enregistrée pendant 15 minutes puis les molécules compétitrices ou extrait sont ajoutées au mélange réactionnel pour une concentration finale de 100 $\mu\text{g/mL}$. L'émission de fluorescence est alors enregistrée pendant 1 heure à 460 nm après excitation à 355 nm. Les valeurs obtenues sont traitées en différentes étapes. D'abord, le coefficient directeur de la pente avant et après ajout de compétiteur est déterminé pour chaque condition à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 paramétré sur le modèle de régression linéaire. Puis, la moyenne de ces coefficients directeurs de pente a été calculée. Cette moyenne a permis de calculer le rapport de variabilité R pour chaque condition de la façon suivante :

$$R = \frac{\text{Pente déterminée pour une condition}}{\text{Moyenne des pentes}}$$

Ensuite, après avoir délimité la phase linéaire de l'activité estérase après ajout de compétiteurs, les pentes sont déterminées comme précédemment. Ces données sont alors utilisées pour calculer l'indice d'activité I :

$$I = \frac{\text{Pente après ajout d'un compétiteur} \times R}{\text{Pente après ajout de DMSO}}$$

Les compétiteurs étant repris dans du DMSO, une condition pour vérifier l'effet du DMSO sur l'activité estérase a été réalisée. L'indice de cette condition a été utilisé pour déterminer les pourcentages d'activité estérase P (%) de la manière suivante :

$$P (\%) = \frac{\text{Indice d'activité après ajout d'un compétiteur}}{\text{Indice d'activité après ajout de DMSO}} \times 100$$

8. Résultats

Les deux chapitres précédents rendent compte de la caractérisation biochimique et structurale des membres des GSTs de la classe Phi du peuplier, apportant de précieuses informations sur les propriétés de ces enzymes. Les exemples dans la littérature de caractérisation des fonctions naturelles des GSTs s'appuient généralement sur l'identification de leurs substrats naturels. C'est pourquoi nous avons sélectionné et mis en place deux approches complémentaires ayant pour but d'identifier les substrats physiologiques des GSTs de la classe Phi du peuplier. Ce chapitre s'attache à décrire les résultats obtenus par ces méthodes. La majorité des résultats qui suivent ont été produits par Thomas Perrot dans le cadre de son stage de Master 2 que j'ai contribué à superviser.

8.1. Extraction et analyse des principaux métabolites secondaires contenus dans différents organes/tissus prélevés chez le peuplier (*P. trichocarpa*)

Dans le but d'identifier et de caractériser des substrats ou ligands potentiels des GSTFs, nous avons dans un premier temps entrepris l'extraction de métabolites à partir de différents organes prélevés à partir de peupliers de l'espèce *P. trichocarpa*. Notre choix s'est porté sur les fleurs mâles et femelles, les feuilles et les bourgeons en regard des données d'expression tissulaire obtenues précédemment et présentées dans l'article 1. En effet, les quantités de transcrits de GSTFs s'accumulent préférentiellement dans ces tissus (ou organes), à l'exception des fleurs mâles, qui ont néanmoins été choisies à titre comparatif. Les différents tissus ont été broyés à l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. A partir de cette poudre, l'extraction de métabolites a été réalisée à l'aide d'un extracteur de Soxhlet. Cet appareil permet de réaliser une extraction continue d'une ou plusieurs espèces chimiques contenues dans un échantillon végétal par utilisation successive, dans le cas présent, de quatre solvants de polarité croissante (dichlorométhane, acétone, toluène/éthanol, et enfin eau). Les molécules dites lipophiles (résines, acides gras et terpènes) sont extraites dans le solvant le moins polaire (dichlorométhane) alors que les molécules hydrophiles telles que les sucres et les polyphénols sont extraites grâce à des solvants plus polaires (acétone, mélange toluène/éthanol et eau). Les rendements des extractions successivement réalisées sont reportés dans la figure 43. Ceux-ci varient selon les organes et les solvants utilisés. Globalement, la masse d'extraits obtenus par rapport à la masse sèche initiale est la plus importante à partir des bourgeons (76%) alors qu'elle est trois fois plus faible dans le cas des fleurs femelles (26%). L'eau et le dichlorométhane sont les solvants les plus efficaces tandis que les

rendements des extractions réalisées à l'aide d'acétone ou d'un mélange toluène / éthanol (2 :1, v/v) sont les plus faibles.

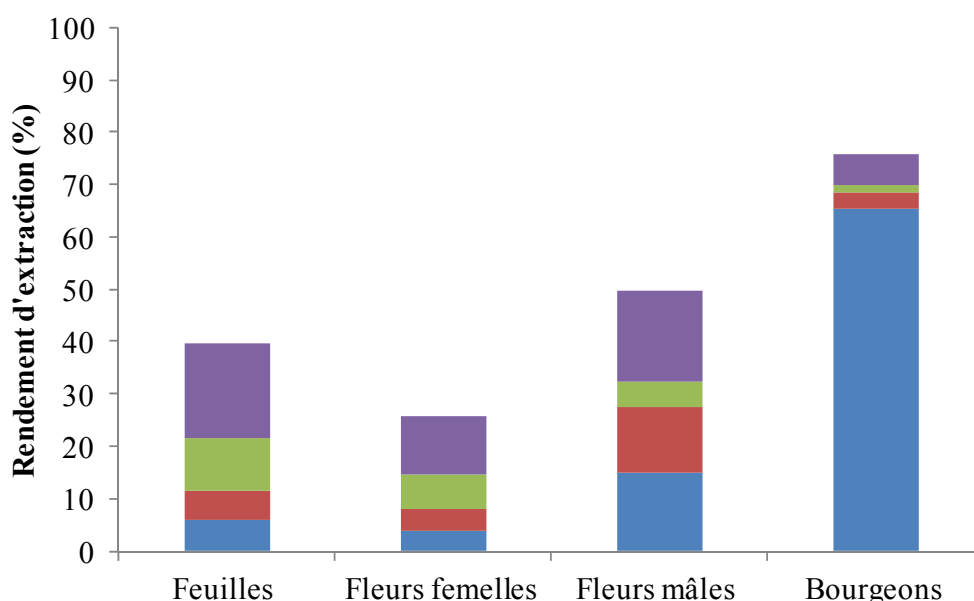


Figure 43 : Rendements d'extractions obtenus pour les quatre organes de peuplier après extraction à l'aide d'un appareil de Soxhlet. Les masses de chaque extrait ont été mesurées après évaporation ou lyophilisation. Les rendements obtenus après extraction au dichlorométhane, à l'acétone, par un mélange toluène / éthanol (2 :1, v/v) et à l'eau sont représentés respectivement en bleu, rouge, vert et violet. Les rendements ont été calculés selon la formule : Rendement (%) = (Masse d'extrait obtenue après extraction / Masse d'échantillon initiale) $\times$ 100.

8.2. Extraction par macération méthanolique à froid

Nous avons également eu recours à une méthode d'extraction par macération méthanolique à froid dans un mélange méthanol/eau (4/1, v/v) qui permet non seulement de prévenir la dénaturation des composé thermosensibles extraits mais aussi de diversifier éventuellement la nature des métabolites récupérés. Ce mélange permet théoriquement d'extraire principalement des composés phénoliques tels que les tannins, les flavonoïdes et les alcaloïdes avec des profils d'extraction comparables à ceux obtenus avec l'appareil de Soxhlet. Néanmoins, le taux de la masse d'extrait obtenu par rapport à celui de l'échantillon est plus faible avec l'extraction méthanolique qu'avec l'appareil de Soxhlet suggérant une certaine sélectivité de cette méthode ou simplement un rendement moindre (figure 44).

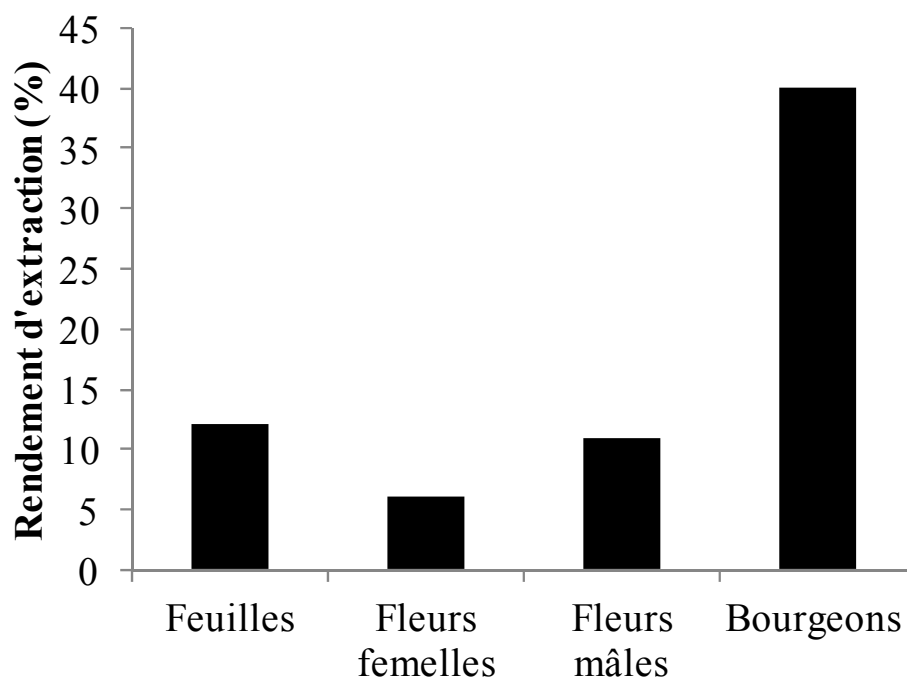


Figure 44 : Rendements d'extraction obtenus pour les quatre organes de peuplier après macération dans un mélange méthanol/eau (4 : 1, v/v). La masse de composés extraits pour chaque organe a été mesurée après évaporation. Les rendements ont été calculés selon la formule : Rendement (%) = (Masse d'extrait obtenue après extraction / Masse d'échantillon initiale) $\times$ 100.

8.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) des extraits obtenus

Les différents extraits ont ensuite été analysés par GC-MS et les principaux composés détectés sont listés dans le tableau 4. Globalement, les composés glucidiques sont majoritairement retrouvés dans les feuilles indépendamment du solvant utilisé. Dans les bourgeons, les métabolites extraits sont de nature variée (présence de terpènes, de flavonoïdes) notamment après extraction au dichlorométhane et par mélange méthanol/eau (4/1, v/v). L'eudesmol est le terpène le plus présent dans ces extraits, mais il est aussi présent dans les fleurs femelles. Outre la diversité de terpènes présente dans les bourgeons, les flavonoïdes sont aussi très représentés dans ces mêmes organes alors qu'ils ne sont pas retrouvés dans les fleurs mâles, ni dans les fleurs femelles. L'aucubine et la désulfo-sinigrine sont spécifiquement retrouvées dans les fleurs mâles tandis que dans les fleurs femelles, la présence de pulchelloside I et d'arbutine permet de les distinguer par rapport aux autres organes. Ainsi, ces deux méthodes d'extraction nous ont permis d'obtenir une diversité

importante de métabolites. Dès lors, cette gamme de composés a été utilisée pour rechercher les substrats et ligands naturels des 8 isoformes de GSTFs de peuplier.

Résultats

Extractions	Appareil de Soxhlet				Méthanolique
Organes	Dichlorométhane	Acétone	Toluène / éthanol (4:1, v/v)	Eau	Méthanol 80 / Eau 20
Feuilles	<u>Composés aromatiques</u> : α -tocophérol <u>Acides gras</u> : Glycérol de monolinoléoyle <u>Terpènes</u> : Acétate de phytol, <i>trans</i> -géranylgéraniol <u>Hydrocarbures</u> : Heptacosane, heneicosane <u>Stérols</u> : γ - et β -Sitostérol	<u>Sucres</u> : Glucopyranose	<u>Sucres</u> : Fructofuranose	ND	<u>Sucres</u> : Lyxofuranose, sorbofuranose, fructofuranose, talofuranose, glucopyranose, xylopyranose, allofuranose, tagatofuranose, turanose, sorbitol
Fleurs mâles	<u>Composés aromatiques</u> : Acide benzoïque <u>Sucres</u> : Désulpho-sinigrine (glucosinolates), fructopyranose <u>Acides gras</u> : Acide palmitique <u>Hydrocarbures</u> : Heptacosane <u>Stérols</u> : γ -Sitostérol	<u>Composés aromatiques</u> : Acide benzoïque <u>Sucres</u> : Fructopyranose, glucopyranose, xylopyranose <u>Acides gras</u> : Acide octadecatrienoiq, glycérol de monolinoléoyle <u>Terpènes</u> : Aucubine	<u>Composés aromatiques</u> : 1-diméthyl (isopropyl) silyloxy-2-phényléthane <u>Sucres</u> : Désulpho-sinigrine (glucosinolates), fructopyranose <u>Acides gras</u> : Acide palmitique <u>Hydrocarbures</u> : Heptacosane <u>Stérols</u> : γ -Sitostérol	ND	<u>Terpènes</u> : β - et α - Eudesmol
Bourgeons	<u>Composés aromatiques</u> : Acide paracoumarique, acide caféique, acide férulique, acide cinnamique, acide vanylmandélique, acide 3-hydroxyanthranilique, genkwanine <u>Flavonoïdes</u> : Pinostrobin, pinocembrine, techtochrysine, acacétine <u>Terpènes</u> : α -Copaen-11-ol, γ - et β -eudesmol, cadinène, (-) spathuléol <u>Acides gras</u> : Acide palmitique, acide linoléique, acide oléique, acide stéarique <u>Stéroïdes</u> : Androstan-3-one	<u>Sucres</u> : Arabinofuranose, mannose <u>Composés aromatiques</u> : Acide caféique	ND	ND	<u>Composés aromatiques</u> : Acide paracoumarique, acide cinnamique, acide 3-hydroxyanthranilique <u>Flavonoïdes</u> : Pinostrobin, naringénine, chrysine, sakuranétine, pinocembrine <u>Acides gras</u> : Glycérol de monolinoléoyle <u>Terpènes</u> : α -Copaen-11-ol, β -, γ - et α -eudesmol
Fleurs femelles	<u>Terpènes</u> : β -Eudesmol <u>Acides gras</u> : Acide pentadecanoïque, acide myristique. <u>Stérols</u> : γ -Sitostérol	<u>Composés aromatiques</u> : Acide benzoïque, acide paracoumarique <u>Sucres</u> : Arabinose, thymol- β -d-glucopyranoside, arbutine <u>Terpènes</u> : Pulchelloside I, aucubine	<u>Composés aromatiques</u> : Acide benzoïque <u>Alcaloïdes</u> : 2,6-Pyridinediol	<u>Sucres</u> : Fructopyranose, glucopyranose	<u>Acides gras</u> : Acide palmitique <u>Terpènes</u> : β -Eudesmol

Tableau 4 : Liste des principaux composés détectés par GC/MS dans des extraits métaboliques d'organes de peuplier. Pour les résultats d'analyses comportant la mention ND, aucun pic n'était observable sur le chromatogramme et/ou les pourcentages d'identité de la molécule ne permettaient pas son identification sur la base de données.

8.4. Recherche de substrats et de ligands potentiels des GSTFs de *P. trichocarpa*

Dans le but d'identifier de nouveaux substrats ou ligands des 8 isoformes de GSTFs, deux approches complémentaires ont été utilisées. La première méthode, adaptée à l'utilisation des appareils de PCR quantitative en temps réel, consiste à analyser la thermostabilité des protéines en présence de ligands potentiels. Cette méthode consiste à mesurer des variations d'intensité de fluorescence en fonction de la température (Fluorescence-based Thermal Shift Assay). Cette propriété peut permettre de déterminer la fixation d'un ligand, substrat ou inhibiteur, au niveau de n'importe quel site de fixation d'une protéine cible en observant le déplacement de la courbe de dénaturation de la protéine. La seconde méthode est basée sur l'inhibition de l'activité enzymatique estérase d'une GSTF contre le 4-méthylumbelliféryl acétate (4-MOA), une molécule fluorescente. L'inhibition de cette activité enzymatique permet d'évaluer la présence d'un substrat/ligand spécifiquement au sein du site catalytique.

8.5. Etude de l'interaction GSTF-ligands/substrats par analyse de la thermostabilité des protéines (Fluorescence-based Thermal Shift Assay)

Cette méthode met à profit la déstructuration progressive des protéines entraînée par une augmentation graduelle de la température qui conduit à l'exposition de leurs cœurs hydrophobes. La dénaturation d'une protéine peut être suivie à l'aide de sondes fluorescentes telles que le SYPRO[®] Orange, une molécule qui émet un fort signal fluorescent lorsqu'elle se trouve dans un environnement moléculaire hydrophobe. Au contraire, lorsque cette molécule se trouve dans un environnement aqueux, elle n'en émet pas. Au cours de la dénaturation thermique d'une protéine, ses régions hydrophobes sont progressivement exposées et lient le colorant qui va progressivement émettre de la fluorescence suite à l'exclusion de molécules d'eau. La mesure de l'émission de fluorescence permet de dresser un thermogramme qui rend compte du suivi de la dénaturation d'une protéine en fonction de l'augmentation de la température. La valeur à laquelle 50% de la protéine est dénaturée correspond à sa température de fusion (T_m). La liaison d'un ligand sur une protéine a généralement un effet stabilisateur qui se caractérise par une augmentation de la température de fusion et parfois déstabilisateur qui entraîne une diminution de la température de fusion (figure 45). La comparaison des températures de fusion d'une protéine incubée en présence et en absence de molécules constitue donc un moyen d'identifier ces ligands/substrats.

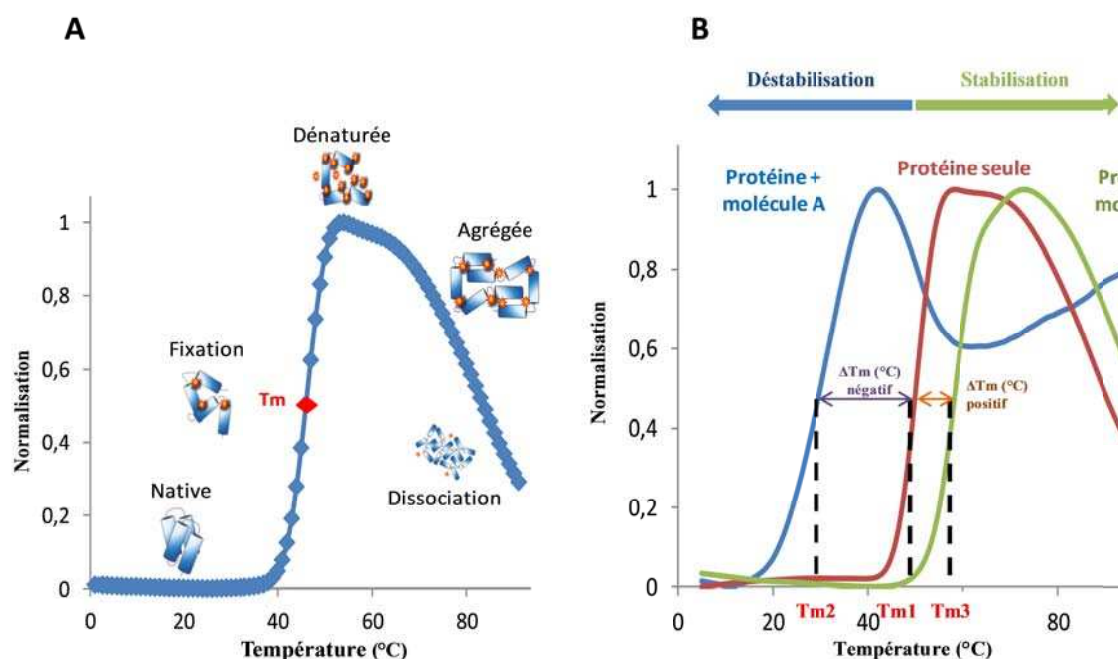
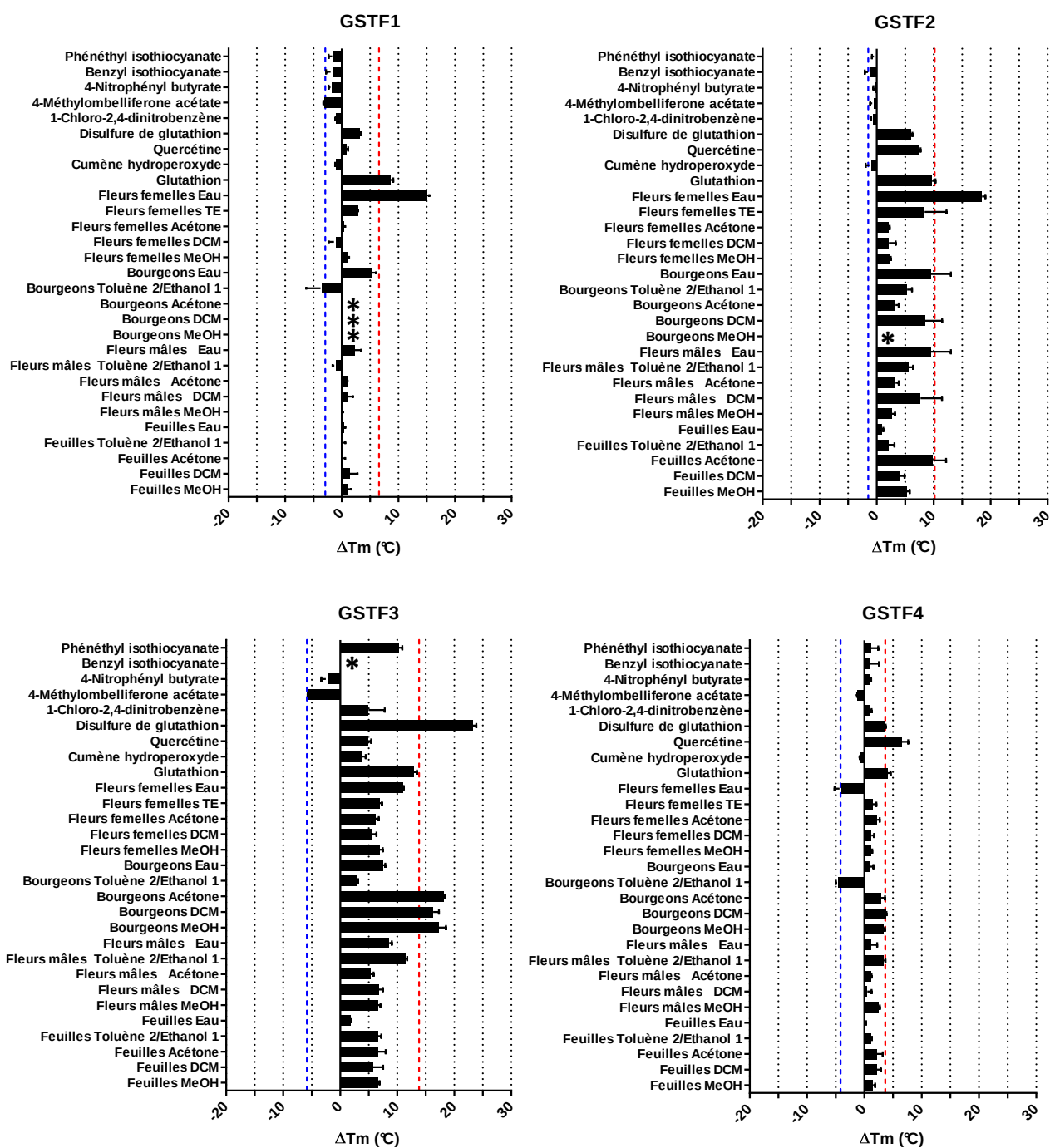


Figure 45 : Principe de la mesure de thermostabilité des protéines par fluorescence. (A) Une solution protéique est chauffée en présence de SYPRO Orange (représenté par des ronds orange), molécule devenant fluorescente après fixation spécifique sur les zones hydrophobes des protéines. L'augmentation de la température entraîne une déstructuration de la protéine qui expose alors ses zones hydrophobes où les molécules de SYPRO vont se fixer, ce qui permet d'obtenir une courbe de dénaturation thermique ou thermogramme. La valeur à laquelle 50% de la protéine est dénaturée correspond à sa température de fusion (T_m). Au-delà d'une certaine température, la fluorescence diminue drastiquement en raison de la dissociation des protéines et de la libération des molécules de la sonde fluorescente. (B) Thermogramme représentant les effets sur la thermostabilité d'une protéine seule (rouge), d'une molécule A ayant un effet déstabilisant sur la protéine (bleu) et d'une molécule B ayant un effet stabilisant sur la protéine (vert).

La thermostabilité des 8 GSTFs de peuplier a été étudiée vis-à-vis des extraits préparés à partir des différents organes de peuplier (figure 46). Certains substrats couramment utilisés pour la caractérisation biochimique des GSTs tels que le glutathion réduit, le glutathion oxydé, le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène, l'hydroperoxyde de cumène ont également été testés à titre comparatif. La quercétine a également été choisie comme représentant de la classe des molécules des flavonoïdes puisque il a été reporté à plusieurs reprises que certaines GSTs Phi d'autres espèces sont capables d'interagir avec ce type de molécule (Cummins *et al.*, 2013). Le 4-méthylumbelliféryl acétate, molécule qui sera utilisée ultérieurement dans un test de compétition enzymatique, a également été testée.



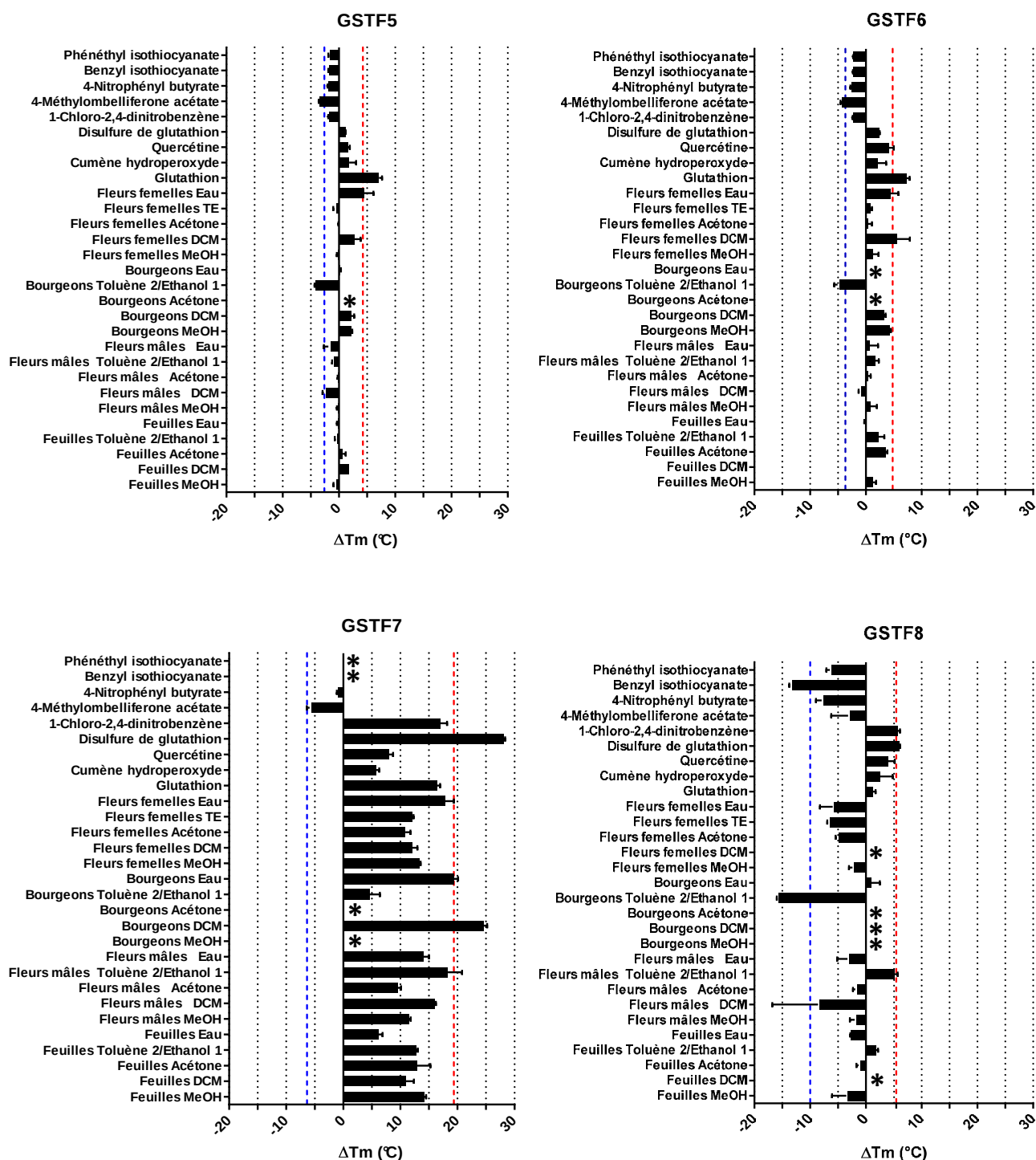


Figure 46 : Effets des différents extraits métaboliques sur la thermostabilité de GSTF1-8. Les valeurs seuils positives et négatives sont représentées respectivement en rouge et en bleu, elles correspondent à la moyenne des valeurs positives ou négatives obtenues additionnée d'un écart-type. La courbe de dénaturation thermique de certaines GSTFs en présence de certains extraits était trop atypique pour permettre la détermination de la température de fusion (*). DCM, MeOH et TE spécifie que l'extraction a été réalisée respectivement par le dichlorométhane, le méthanol et un tampon Tris-HCl 30 mM pH 8,0, 1 mM d'EDTA.

D'après les résultats obtenus et présentés sur la figure 46, on constate tout d'abord que les GSTF2, 3 et 7 sont plus sensibles aux différentes molécules testées ce qui se traduit par des variations de température de fusion globalement plus importantes que pour les autres isoformes. D'autre part, nous avons observé un effet récurrent de quelques extraits. D'une façon générale, le 4-méthylumbelliféryl acétate a un effet déstabilisant tandis que le glutathion, le substrat physiologique des GSTs, et le disulfure de glutathion ont un effet stabilisant sur ces enzymes. Cela est en accord avec des observations précédentes qui ont montré que les protéines dénuées de glutathion suite à un traitement réducteur tendent à précipiter, indiquant que le GSH contribue à la stabilisation de ces protéines. Il est intéressant de noter que les substrats catalysés par les GSTs comme le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène, le phenethyl isothiocyanate et le PNP-butyrate n'ont pas nécessairement un effet très prononcé sur les GSTFs à l'exception du benzyl isothiocyanate qui a un effet déstabilisant sur GSTF8. Certaines molécules ou extraits ont un effet spécifique sur certaines isoformes. Les extraits aqueux de fleurs femelles ont un effet stabilisateur marqué sur les isoformes GSTF1 et 2 tandis que différents extraits obtenus à partir des bourgeons, très riches en flavonoïdes, présentent généralement un effet stabilisateur sur GSTF3 et 7. Il est d'ailleurs intéressant que certains thermogrammes de GSTFs en présence des extraits réalisés à partir de bourgeons sont tellement atypiques qu'il était impossible de déterminer la température de fusion. Les molécules contenues dans les extraits de bourgeons ont certainement un effet sur les isoformes en question mais cela requiert d'être examiné par d'autres méthodes. Par ailleurs, l'extrait bourgeon toluène/éthanol présente un effet déstabilisateur sur GSTF5, 6 et 7. Enfin, la quercétine a un effet stabilisateur significatif uniquement sur GSTF4, suggérant une spécificité pour cette isoforme.

8.6. Effets des fractions extraites à l'eau à partir de fleurs femelles de peuplier sur la thermostabilité de GSTF1

L'analyse de la thermostabilité des protéines ayant donné des résultats encourageants avec GSTF1 et GSTF2 envers les extraits obtenus à partir de fleurs femelles de peuplier (extraction à l'eau), nous avons procédé à la séparation de cet extrait par HPLC en 56 fractions différentes dans la perspective d'identifier la ou les molécules responsables de cette stabilisation. Après fractionnement, nous avons alors testé l'impact de ces fractions sur la stabilité de GSTF1. Les résultats obtenus montrent que la fraction n°43 engendre un déplacement thermique positif de 13°C, valeur proche du déplacement initial de 15°C observé avec l'extrait à l'eau non fractionné de fleurs femelles (figure 47) alors que la fraction n°42

présente plutôt un effet opposé ($\Delta T_m = -7^\circ\text{C}$). Ces résultats sont préliminaires et l'identification par GC-MS de la ou des molécule(s) retrouvée(s) dans les fractions n°42 et 43 est actuellement en cours. Si l'approche s'avère fructueuse, d'autres extraits tels que les bourgeons qui présentent à plusieurs reprises des effets contre différentes GSTFs seront également fractionnés.

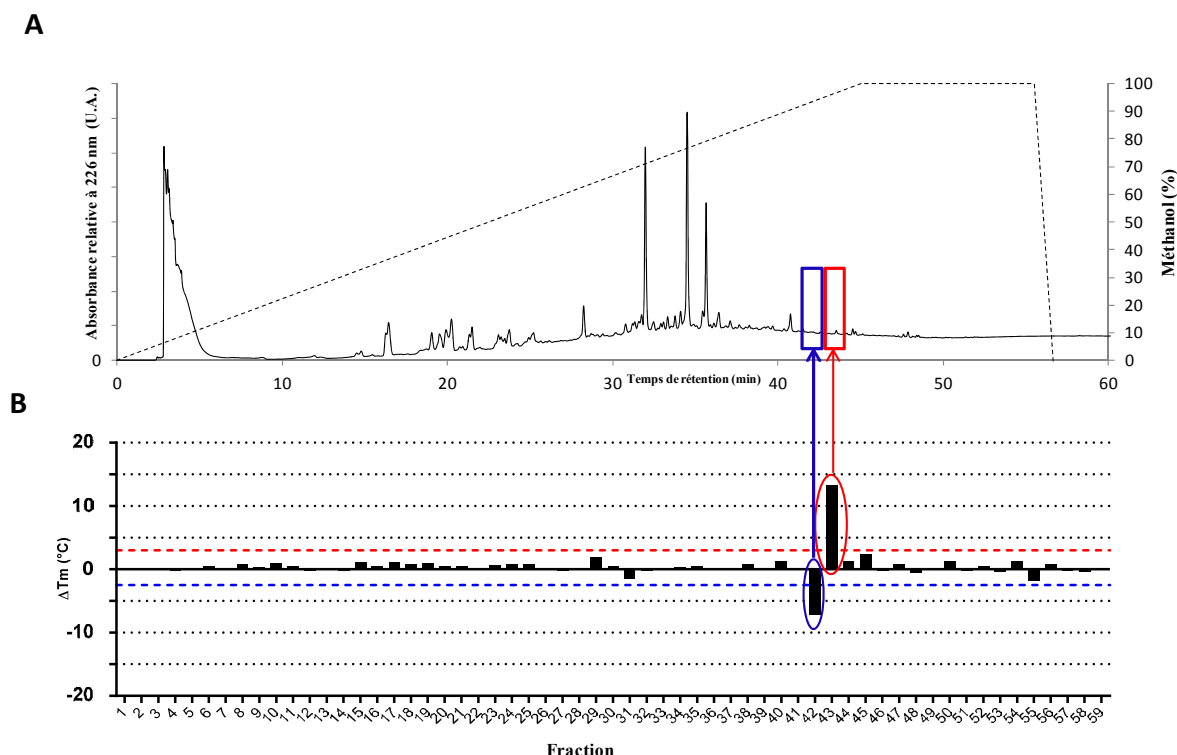


Figure 47 : Fractionnement des extraits de fleurs femelles (extraction à l'eau) par HPLC et analyse des fractions récoltées par dénaturation thermique. (a) Chromatogramme de séparation des extraits de fleurs femelles de peuplier obtenu par chromatographie en phase liquide à haute performance. Les extraits ont été chargés sur une colonne Kinetex biphenyl (250 x 4,6 mm) préalablement équilibrée avec un tampon eau/acide formique 0,1% et éluées par un gradient linéaire de méthanol (0 à 100%) sur une durée de 45 minutes. L'éluution à 100% de méthanol a été poursuivie pendant 10 minutes supplémentaires (b) Effets des fractions HPLC sur la thermostabilité de GSTF1.

8.7. Mesure de l'activité estérase de GSTF1 de peuplier

L'activité estérase de GSTF1 a été mesurée envers le 4-méthylumbelliféryl acétate (4-MOA). Au cours de cette réaction enzymatique, la liaison ester du 4-MOA est hydrolysée et conduit à la libération d'eau et de 4-méthylumbelliférone, composé chimique dont l'apparition peut être suivie par spectrofluorimétrie à 460 nm après excitation à 355 nm. En utilisant des concentrations croissantes de 4-MOA une courbe de saturation typique d'une

cinétique de type Michaelis-Menten a été obtenue. Les paramètres cinétiques (K_m et k_{cat}) ont alors été déterminés (tableau 5). En présence de glutathion (1 mM), l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) de GSTF1 est accrue d'un facteur 11, passant de $12,5 \pm 1,98$ à $135,48 \pm 8,79 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette augmentation est essentiellement attribuée à l'augmentation de la constante catalytique (k_{cat}) de l'enzyme passant de $0,0065 \pm 0,0011$ à $0,042 \pm 0,003 \text{ s}^{-1}$ alors que l'affinité apparente pour le substrat (K_m^{app}) est relativement stable.

4-MOA	- GSH	+ GSH
$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	$0,0065 \pm 0,0011$	$0,042 \pm 0,003$
$K_m (\text{mM})$	$0,555 \pm 0,175$	$0,308 \pm 0,046$
$k_{cat}/K_m (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$12,5 \pm 2,00$	$135,48 \pm 8,79$

Tableau 5 : Paramètres catalytiques de l'activité estérase de GSTF1 envers le 4-méthylumbelliféryl acétate en absence ou en présence de 1 mM de glutathion.

L'activité estérase portée par la protéine GSTF1 demeure relativement faible comparée à l'activité de glutathionylation du CDNB, environ 10 fois inférieure. Elle reste néanmoins suffisamment élevée pour être exploitée au cours de tests d'inhibition enzymatique. D'autre part, l'activité estérase envers le 4-MOA est mesurée à 460 nm, une longueur d'onde à laquelle les molécules testées n'émettent *a priori* pas de fluorescence ce qui constitue un élément important en faveur de cette méthode. Au contraire, des substrats plus classiques tels que le CDNB ou le PNP-butyrate ne seraient pas adéquats pour des tests d'inhibition puisque le suivi de l'activité envers ces substrats est réalisé à des longueurs d'onde auxquelles plusieurs des molécules testées absorbent. Cette méthode permet d'évaluer spécifiquement la fixation d'une molécule dans le site actif ou d'une molécule modifiant la conformation allostérique du site actif.

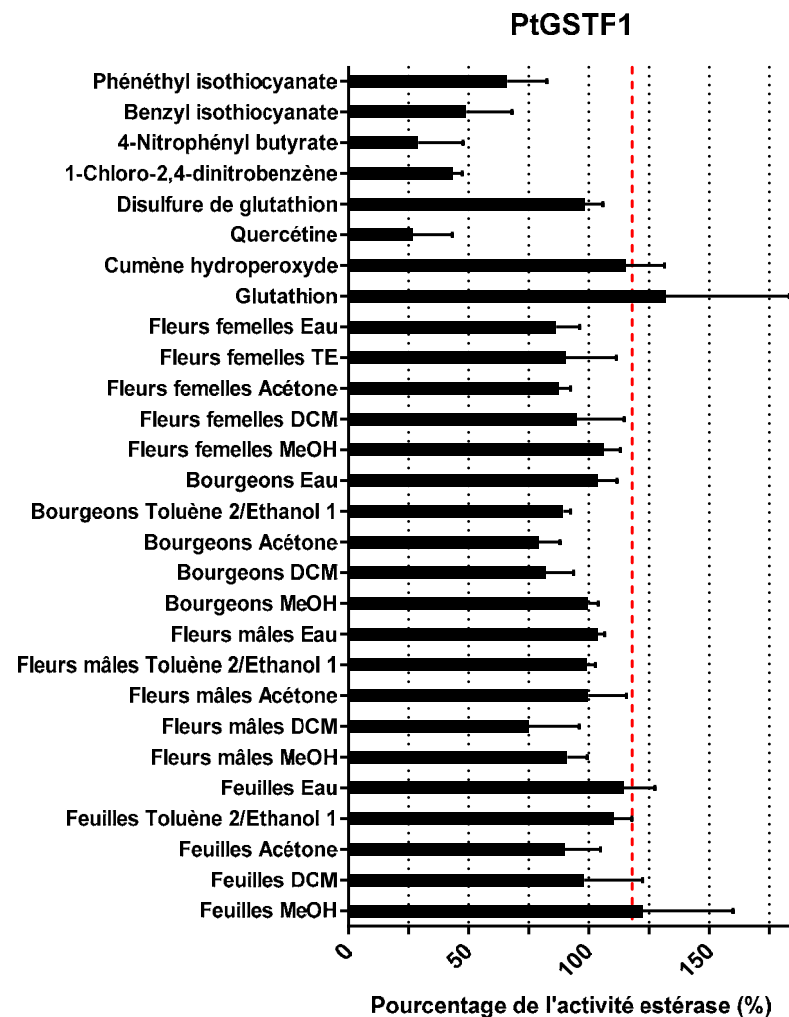


Figure 48 : Effets des différents extraits métaboliques ou molécules (100 µg/mL) sur l'activité estérase de GSTF1 contre le 4-MOA. Le pourcentage de l'activité estérase est calculé par rapport à l'activité estérase en présence de DMSO. La valeur seuil positive (correspondant à la moyenne des valeurs positives obtenues additionnée à l'écart type) est représentée en rouge.

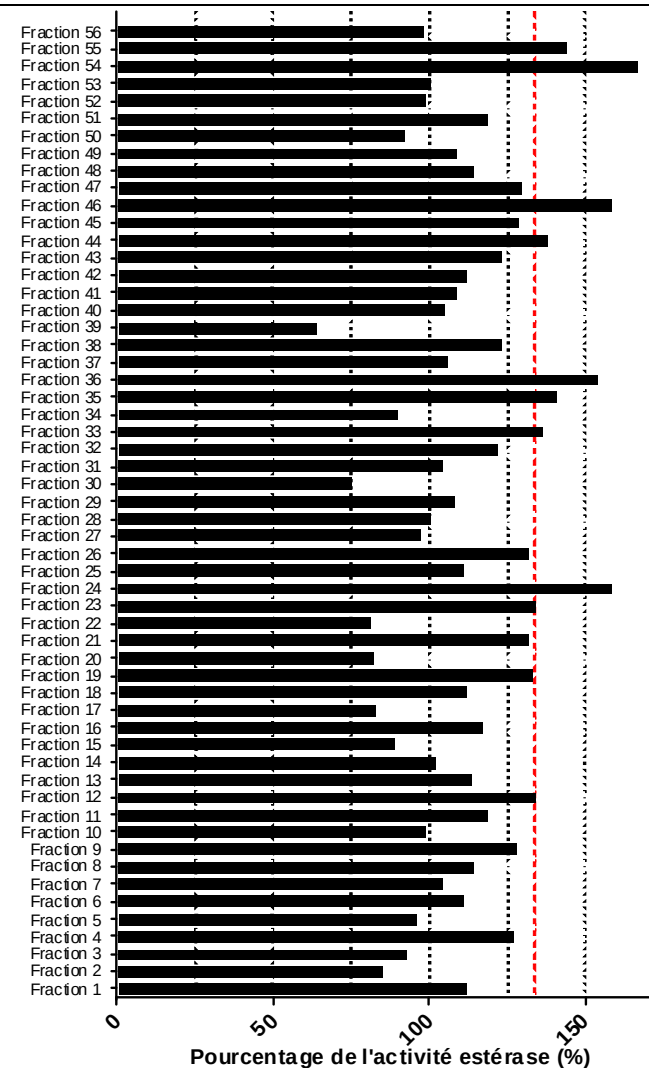


Figure 49 : Effet des fractions récoltées issues de la séparation par HPLC de l'extrait à l'eau de fleurs femelles de peuplier (100 µg/mL) sur l'activité estérase de GSTF1 contre le 4-MOA. Le pourcentage de l'activité estérase est calculé par rapport à l'activité estérase en présence de DMSO. La valeur seuil positive (correspondant à la moyenne des valeurs positives obtenues additionnée à l'écart type) est représentée en rouge.

Une fois les paramètres cinétiques déterminés contre le 4-MOA, nous avons testé l'effet inhibiteur de notre banque d'extraits et de molécules chimiques sur l'activité estérase de GSTF1 (figure 48). En présence de CDNB, de PNP-butyrate ou de BITC substrats modèles des GSTFs, nous avons mesuré une réduction de l'activité estérase de GSTF1 de 56%, 71% et 51%. Ces résultats suggèrent que cette sonde est spécifique du site actif. Néanmoins, l'hydroperoxyde de cumène, un substrat reconnu par les GSTFs n'entraîne pas d'inhibition significative de l'activité estérase de GSTF1 mais plutôt une activation de celle-ci. Les différents extraits de métabolites d'organes/tissus de peuplier provoquent une inhibition de l'activité estérase modérée et relativement homogène. D'ailleurs, l'extrait à l'eau des fleurs femelles, n'a pas d'effet sur l'activité estérase de GSTF1 contrairement à ce qui avait été observé sur sa thermostabilité. Les extraits de bourgeons avec le dichlorométhane et l'acétone, riches en flavonoïdes, présentent les effets inhibiteurs les plus prononcés parmi les différents extraits sur l'activité estérase de GSTF1. A cet égard, la quercétine présente un effet inhibiteur très accentué avec une réduction de l'activité estérase de GSTF1 de 73%. Ces résultats suggèrent que les molécules de la classe des flavonoïdes pourraient constituer des ligands de cette isoforme.

L'effet des différentes fractions de l'extrait aqueux de métabolites de fleur femelle séparées par HPLC a également été testé sur l'activité estérase de GSTF1 (figure 49). Les fractions n° 42 et 43 qui avaient un effet sur la stabilité thermique de GSTF1 n'ont pas montré d'effet inhibiteur sur son activité estérase, suggérant probablement une propriété ligandine de GSTF1 pour l'une ou l'autre des molécules présentes dans les fractions n° 42 et 43. En revanche d'autres fractions qui n'entraînaient pas d'effet stabilisateur sur la dénaturation thermique de GSTF1 engendrent un fort effet inhibiteur de son activité estérase. C'est le cas par exemple des fractions n°39 (activité estérase réduite de 36%), 30 (25%) et 22 (19%). A l'inverse, certaines fractions ont un effet activateur sur l'activité estérase de GSTF1 telles que les fractions n°54 (167% de l'activité initiale), 46 (158 %), 36 (154 %) ou 24 (156 %). L'identification des molécules présentes ces fractions par GC-MS est en cours. Il convient de noter que des réplicats doivent être réalisés pour ces tests d'inhibition envers les différentes fractions de fleur femelles afin de consolider ces résultats.

Les différentes approches présentées dans les paragraphes précédents ont été mises en place durant la dernière partie de ma thèse et sont encore en cours, d'où la nature incomplète de certains résultats. Cette démarche pose les premières pierres de méthodes visant à identifier et à caractériser des substrats physiologiques des GSTs de la classe Phi et plus généralement

des GSTs au sein de notre laboratoire. A l'instar de l'analyse de la thermostabilité des protéines, la mesure de l'activité estérase est réalisée à l'aide de plaques 96 puits et ne nécessite que de faibles quantités de protéines ce qui permet de cribler rapidement de nombreuses molécules ou extraits. Certaines fractions métabolites / composés ont été détectés par ces méthodes et, comme mentionné précédemment, l'identification de leur nature est actuellement en cours par GC/MS. Une fois identifiées, des analyses complémentaires telles que la titration calorimétrique isotherme permettront de définir si ces molécules constituent réellement des substrats physiologiques de ces enzymes.

Discussion et perspectives

L'une des thématiques de recherche de l'équipe « Réponse aux Stress et Régulation Redox » dans laquelle ont été réalisés ces travaux porte sur la caractérisation structure-fonction de protéines appartenant à la superfamille des thiorédoxines. A cet égard, un pan de cette thématique est dédié à l'étude de différentes classes de glutathion transférases fortement développées ou spécifiques aux règnes fongique et végétal. A travers des approches moléculaires, biochimiques et structurales, les travaux de notre équipe visent à comprendre le rôle de ces protéines. Mon projet de thèse avait pour objectif de sonder la diversité fonctionnelle des huit gènes codant des GSTs de la classe Phi chez *P. trichocarpa*. Le travail effectué lors de ces trois années a permis de caractériser finement certains aspects du mécanisme réactionnel utilisé par les GSTs de la classe Phi, en déterminant notamment les paramètres cinétiques et d'interaction des huit enzymes de cette classe et de plusieurs variants mutés pour des résidus clés vis-à-vis de plusieurs substrats modèles. Ceci a été complété par des données structurales inédites et une analyse exhaustive des territoires d'expression des gènes candidats. De plus la phylogénie des GSTFs a été analysée en détail chez les plantes terrestres. Des résultats préliminaires ont également été obtenus, portant sur la recherche de substrats physiologiques de ces GSTs Phi. La portée de ce travail sera discutée et mise en perspective dans les prochains paragraphes.

9. Expansion et cas de la redondance fonctionnelle de la classe GSTF du peuplier

En général, les classes de GSTs spécifiques à un règne comportent très souvent bien plus d'isoformes que les classes retrouvées dans plusieurs règnes. Elles permettent typiquement de répondre à des contraintes environnementales spécifiques à ce règne. A titre d'exemple, les GSTFuAs retrouvées chez les champignons sont impliquées dans le clivage des liaisons éther β -aryle que l'on retrouve abondamment dans les polymères de lignine qui composent le bois. Un nombre important de gènes GSTFuAs est présent dans les génomes d'espèces de champignons interagissant avec le bois (saprophyte, nécrotrophe) tandis qu'aucune GSTFuA n'a été recensée chez les espèces qui n'interagissent pas avec le bois (Morel *et al.*, 2013). Selon la même logique et étant donné la forte aptitude de détoxification des GSTs des classes Phi et Tau, il peut être supposé que la forte expansion de ces deux classes contribue à la réponse adaptative permettant aux plantes de faire face aux nombreux composés toxiques de leurs environnements. En effet de par leur mode de vie immobile, les plantes sont exposées à de nombreuses molécules toxiques telles que des substances allélopathiques, des toxines bactériennes ou fongiques ou encore issues de leur propre métabolisme secondaire. Il est d'ailleurs souvent admis que ce style de vie est à l'origine des systèmes de détoxification très développés chez les plantes. Ainsi, le besoin de surmonter la toxicité de ces composés toxiques s'est concrétisé par une expansion des familles de gènes constituant le xénome. Le xénome semble être extrêmement complexe chez les plantes, par exemple le petit génome d'*A. thaliana* présente au moins 350 gènes de cytochrome P450 monooxygénases, 51 GSTs et 129 transporteurs ABC (Edwards *et al.*, 2005). En comparaison, le nombre de gènes composant les xénomes animaux est bien plus petit. D'autre part, la littérature décrit la coévolution entre les plantes et leurs prédateurs comme une course à l'armement. Les plantes ont développé des stratégies d'adaptation pour survivre à de nombreuses situations défavorables. L'une d'entre elle est basée sur la synthèse de molécules bioactives dérivées de précurseurs universels du métabolisme primaire. Par exemple, la biosynthèse de composés allélopathiques leur permet de faire face aux différents herbivores et pathogènes. En plus de leur appartenance au xénome, les cytochrome P450 monooxygénases sont régulièrement décrits dans les voies de synthèse et le métabolisme de composés allélopathiques (Rasool *et al.*, 2015). Il a été montré récemment qu'une GSTF était impliquée dans la synthèse d'une phytoalexine et que les GSTLs pouvaient assurer *in vitro* la réduction de formes glutathionylées de certains flavonoïdes, des antioxydants (Dixon *et al.*,

2010, Lallement *et al.*, 2014) Ainsi, la double implication des GSTs, à l'instar des cytochrome P450 monooxygénases, dans les processus de détoxification cellulaire et le métabolisme cellulaire contribue à expliquer l'expansion de cette famille mais complique clairement les analyses génomiques et les prédictions associées. De plus, il est intéressant de noter que l'analyse de la variation du nombre de copies de gènes codant les GSTs et les cytochromes P450 monooxygénases a montré l'existence d'une corrélation entre ces deux familles chez les plantes (Harms *et al.*, 2011), comme chez les champignons (Morel *et al.*, 2013).

A partir de l'arbre phylogénétique des GSTFs de peuplier (figure 50 A), de leur localisation chromosomique (figure 50 B) et de leur similarité de séquence (figure 50 C), un scénario de l'histoire évolutive de cette classe peut être proposé (figure 50 D).

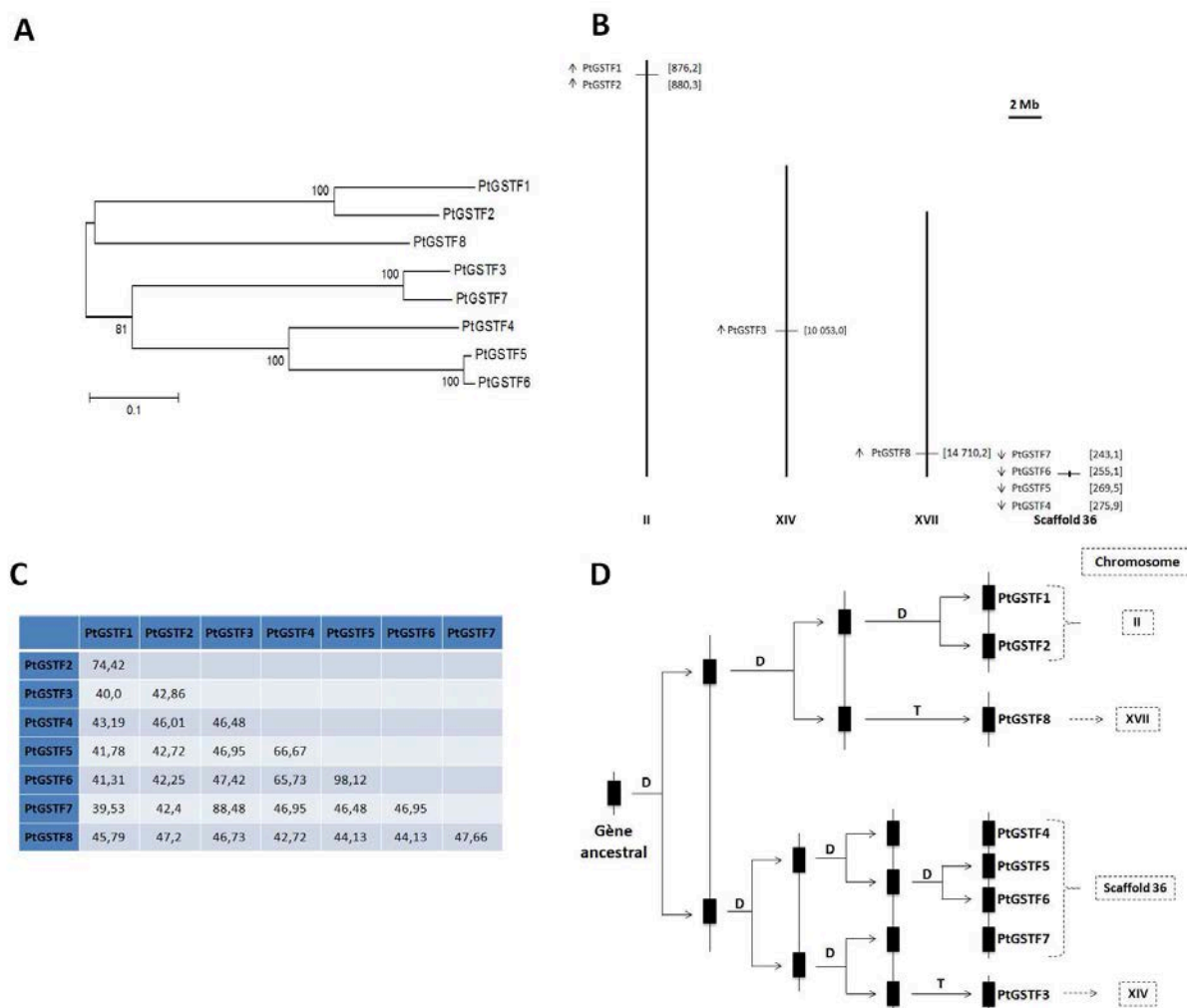


Figure 50 : Phylogénie et évolution des GSTFs de *P. trichocarpa*. (A) Arbre phylogénétique construit à partir des séquences GSTFs de *P. trichocarpa* selon la méthode neighbor-joining. La robustesse de l'arbre phylogénétique a été testée par la méthode du bootstrap (10000 répétitions) et les valeurs obtenues sont indiquées aux différents embranchements. L'échelle représente 0,1 nombre de substitutions par site. (B) Distribution des *GSTFs* sur le génome de *P. trichocarpa*. Le sens de la transcription des gènes est indiqué par une flèche et le nombre entre crochet désigne la position du premier exon de chaque gène en mégabase (Mb). Les chromosomes sont numérotés en chiffre romain. (C) Matrice d'homologie de séquence protéique des GSTFs. (D) Scénario évolutif des GSTFs de *P. trichocarpa*. La lettre D indique un événement de duplication tandis que la lettre T indique un événement de transposition.

A partir d'un gène ancestral, six événements de duplication en tandem ainsi que deux événements de transposition auraient donné naissance aux différents gènes de la classe Phi du peuplier. L'analyse de l'homologie entre ces protéines montre que les séquences ont plus ou

moins divergé depuis ces événements de duplication. Par exemple, GSTF5 et 6 partagent plus de 98% d'identité de séquence et résultent probablement d'une duplication récente alors que les gènes codant les GSTF1 et 2 qui présentent 75% d'identité de séquence au niveau des protéines sont a priori issus d'un événement de duplication plus ancien. Ce type de scénario évolutif est assez typique pour des GSTs de plantes (Dixon *et al.*, 2002). En effet, l'image générale qui émerge de l'étude des GSTs dans les génomes de plantes est que la duplication génique est une force évolutive majeur dans l'expansion de cette famille (Labrou *et al.*, 2015). Les modèles évolutifs stipulent qu'un gène existant en plusieurs exemplaires est affranchi des contraintes imposées par la sélection naturelle et plusieurs possibilités s'offrent pour le devenir des gènes dupliqués (Hallé *et al.*, 2008). La duplication de gène conduit à l'existence de deux copies identiques mais une seule est réellement utile. L'accumulation de mutations peut alors entraîner la formation d'un pseudogène. A cet égard, l'analyse du génome de *P. trichocarpa* a mené à l'identification d'un pseudogène de la classe Phi (PtGSTF9), présentant un codon stop prématuré dans la séquence nucléotidique (Lan *et al.*, 2009). Dans certains cas, la conservation de la fonction originelle dans les deux copies est possible menant à la redondance fonctionnelle entre les gènes dupliqués. C'est probablement le cas entre les GSTF5 et 6 de la classe Phi du peuplier qui en plus d'une forte homologie présentent des propriétés biochimiques similaires. L'existence de deux gènes presque identiques avec une même fonction peut conférer un avantage immédiat à l'organisme en raison de la production d'une quantité supérieure de protéine. Une autre possibilité, assez commune, est que les deux copies du gène dupliqué, tout en gardant la fonction originelle, acquièrent des fonctions différentes (sous-fonctionnalisation). Lors de ces travaux de thèse, différents sous-groupes ont été établis en se basant sur la proximité phylogénétique des différentes GSTFs. Dans l'ensemble les gènes d'un même sous-groupe présentent des patrons d'expression tissulaire similaires et les protéines correspondantes des propriétés biochimiques, enzymatiques et structurales analogues bien que des différences aient pu être constatées dans certains cas. Ces GSTFs ne peuvent pas non plus être différenciées sur la base de leur localisation subcellulaire puisque l'absence de séquence d'adressage suggère qu'elles sont toutes cytosoliques. Cette localisation subcellulaire présumée doit tout de même être considérée avec précaution puisque *A. thaliana* GSTF2 fusionnée à la RFP a clairement été identifiée comme étant chloroplastique, en dépit de l'absence de séquence d'adressage (Armbruster *et al.*, 2009). De plus, 2 isoformes d'*A. thaliana* présentent des localisations extra-cytosoliques, GSTF12/TT19 étant partiellement associée au tonoplaste alors qu'un des transcrits de GSTF8 encode une isoforme plastidiale (Thatcher *et al.*, 2001, Sun *et al.*, 2012). Les sous-groupes présentent en

revanche entre eux des différences au niveau biochimique et catalytique clairement plus marquées, suggérant leur sous-fonctionnalisation. Il est souvent rapporté dans la littérature que même les gènes issus de duplications récentes, présentent des patrons d'expression différents, notamment en réponse à différents stress, ainsi que des spécificités de substrat différentes (Labrou *et al.*, 2015). Pour les GSTs, la diversification fonctionnelle semble provenir principalement du domaine C-terminal, responsable de la liaison de substrats. A cet égard, l'étude de multiples séquences de GSTs montre que la pression de sélection sur ce domaine est assez relâchée, ce qui permet la diversification fonctionnelle rapide des nouvelles copies de gènes dupliqués (figure 51) (Labrou *et al.*, 2015). Ces variations au niveau du domaine C-terminal reflètent certainement une spécialisation dans la prise en compte de certains substrats et contribuent à expliquer pourquoi autant de gènes de GST résultant d'événements de duplication, notamment au sein des classes Tau et Phi, ont été retenus au sein des génomes de plantes. Cette variabilité du domaine C-terminal est constatée également pour les GSTFs du peuplier et elle s'illustre notamment par GSTF1 qui présente une délétion de 3 acides aminés au niveau de la région constituant le site H. En revanche, le domaine N-terminal, qui contient les résidus responsables de la fixation du glutathion, est plus conservé.

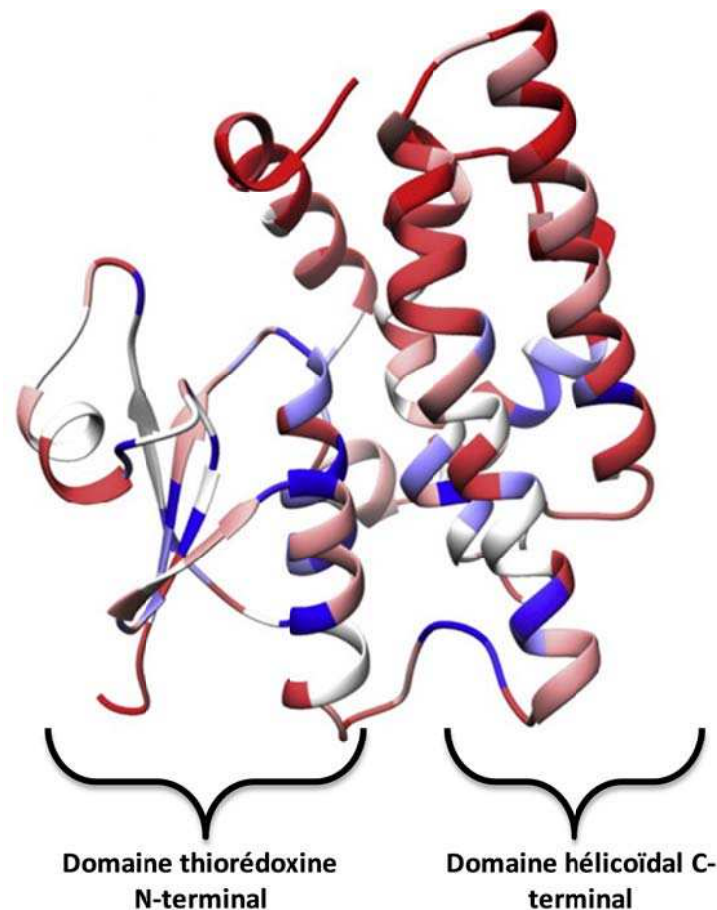


Figure 51 : Conservation des séquences de différentes classes de GSTs de plantes représentée sur une GSTU de *Glycine max* (code PDB : 2VO4) (Labrou *et al.*, 2015). Les couleurs rouge et bleu indiquent respectivement un faible et fort niveau de conservation des résidus.

Enfin une autre possibilité, considérablement plus rare, pour les copies de gènes dupliqués, est que l'une des deux copies acquière une nouvelle fonction (néo-fonctionnalisation). Pour les GSTs, la néo-fonctionnalisation semble principalement se produire *via* le changement de nature du résidu catalytique. Ainsi, dans le modèle évolutif des GSTs canoniques proposé par Frova (Frova 2006), la substitution de la cystéine catalytique ancestrale en sérine est un événement majeur à l'origine de plusieurs classes de GSTs (dont la classe Phi) aux propriétés enzymatiques différentes. Durant ce projet de recherche, nous avons pu identifier que les GSTF3 et F7 chez le peuplier présentaient une cystéine au niveau du motif catalytique en plus de la sérine typique à cette classe (STCT). La présence de ces deux résidus confère à ces enzymes des activités propres aux GSTs à sérine catalytique et à cystéine catalytique. Cette situation est donc un exemple de néo-fonctionnalisation bien que la fonction ancestrale soit conservée. L'analyse phylogénétique des GSTFs de la lignée verte montre que des homologues avec le même motif catalytique sont retrouvés chez d'autres

espèces, suggérant un rôle important et conservé pour ces enzymes. La duplication de gène suivie d'une diversification fonctionnelle par le biais de mutations de résidus au niveau de sites importants d'un point de vue fonctionnel est un mécanisme moteur de l'évolution des protéines. Ce phénomène est observé au sein de la plupart des familles multigéniques. Par exemple, une étude récente a identifié 19 séquences de cytochrome P450 monooxygénases de la sous-famille CYP71AJ chez les apiacées résultant d'une série d'événements de duplication rapprochés (Dueholm *et al.*, 2015). Les cytochrome P450 monooxygénases sont des enzymes qui présentent six sites de reconnaissances de substrats et l'analyse des résidus constituant ces sites dans les CYP71AJs révèlent des variations significatives, suggérant des fonctions biochimiques différentes. Malgré une relativement forte homologie entre ces 19 séquences, deux sous-groupes fonctionnels impliqués dans la biosynthèse de composés de défense et quatre autres sous-groupes ont pu être identifiés. Un parallèle peut être établi avec les GSTFs du peuplier puisque celles-ci résultent de plusieurs événements de duplication, qu'elles présentent un relativement haut degré d'homologie mais que des variations notamment au niveau du motif catalytique confèrent à ces enzymes des propriétés différentes.

10. Variation et importance des acides aminés du motif catalytique des GSTs

La cystéine retrouvée au sein des GSTF3 et F7 est située deux résidus en aval de la sérine catalytique. Les classes de GSTs Lambda et DHAR, plus ancestrales, présentent des motifs catalytiques de type CPxA ou CPFC/S. Il peut donc être supposé que la cystéine rencontrée dans le motif STCT de certaines GSTFs semble être le produit d'une substitution ultérieure à la substitution de la cystéine catalytique ancestrale en sérine. Par ailleurs, la présence d'une cystéine à cette position précise se rencontre de façon récurrente chez des GSTs à sérine catalytique d'horizons phylogénétiques éloignés (figure 52). Il est probable donc qu'il s'agisse de convergences évolutives, une cystéine à cette position étant un trait désirable pour ces GSTs particulières.

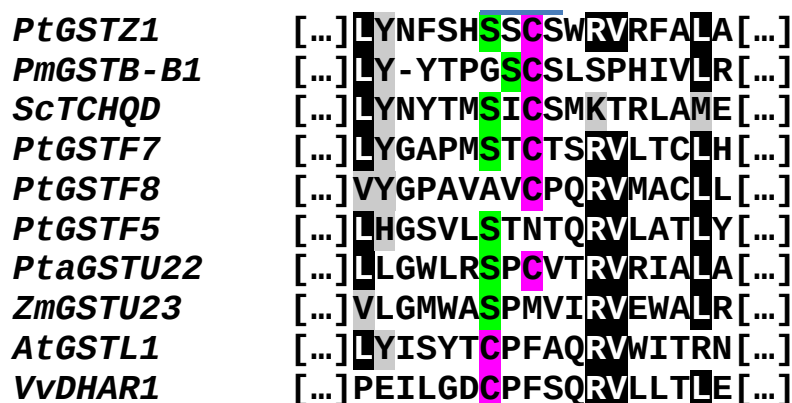


Figure 52 : Alignement partiel de séquence de GSTs de classes différentes au niveau du site actif. La position du motif catalytique est indiquée par une barre bleue. Des représentants des classes Zeta (PtGSTZ1, *P. trichocarpa*), Beta (PmGSTB-B1, *Proteus mirabilis*), TCHQD (ScTCHQD, *Sphingobium chlorophenolicum*), Phi (PtGSTF5, 7, 8, *P. trichocarpa*), Tau (PtaGSTU22, *Pinus tabulaeformis* ; ZmGSTU23, *Oryza sativa*), Lambda (AtGSTL1, *A. thaliana*) et DHAR (VvDHAR1, *Vitis vinifera*) ont été sélectionnés.

Dans certains cas, le rôle de cette cystéine a été étudié. Le pentachlorophénol (un fongicide) est dégradé par la substitution d'un atome de chlore par le glutathion suivi d'une étape de déglutathionylation. Chez *Sphingobium chlorophenolicum*, cette étape de déglutathionylation est assurée par une TCHQD qui possède un motif catalytique de type SICS. L'étude de variants protéiques a montré que cette cystéine est indispensable à cette activité de déglutathionylation (Willett *et al.*, 1996, Kiefer *et al.*, 2002). Cette cystéine possède donc un rôle catalytique au sein de cette classe. En revanche, la situation est différente pour les GSTs Zeta, enzymes hautement conservées chez les eucaryotes qui présentent un motif catalytique conservé de type SSCS. Ces enzymes sont impliquées dans le catabolisme de la tyrosine et assurent la réaction d'isomérisation du maleylacétoacétate en fumarylacétoacétate chez l'ensemble des eucaryotes. Cette réaction d'isomérisation peut d'emblée paraître différente des réactions canoniques assurées par les autres GSTs mais celle-ci consiste en fait en l'ajout et le retrait successifs du glutathion permettant la transformation de la molécule. Cependant, à la différence des TCHQD, la substitution de cette cystéine en alanine chez les GSTZs n'abolit pas complètement leur activité mais entraîne plutôt une diminution de la vitesse réactionnelle de ces enzymes (Board *et al.*, 2003). Cela suggère que cette cystéine possède un rôle différent probablement non catalytique et en tout cas qu'elle n'est pas essentielle à la catalyse. Des données structurales chez *A. thaliana* et *Homo sapiens* indiquent que ce résidu Cys serait plutôt nécessaire à la liaison et à l'orientation correcte du glutathion dans le site actif (Polekhina *et al.*, 2001, Thom *et al.*, 2001). Il est également important de noter à cet égard que les GSTZs bactériennes possèdent la même activité

isomérase et ne présentent naturellement pas de cystéine à cette position (Fang *et al.*, 2011). Un autre exemple intéressant est constitué par la GSTB-B1 de *Proteus mirabilis* qui possède un motif catalytique de type SCSL. Cette enzyme possède des activités typiques des GSTs à sérine et cystéine catalytique. La structure de cette enzyme montre que la première sérine et la cystéine sont à une distance du groupement thiol de la cystéine du glutathion permettant l'interaction avec les deux résidus (figure 53), expliquant ce profil ambivalent. D'autre part, la substitution de la cystéine en alanine de PmGSTB1-B1 entraîne une perte de l'activité de déglutathionylation (Caccuri *et al.*, 2002) en revanche la suppression de la première ou deuxième sérine en alanine n'altère que légèrement l'activité de glutathionylation (Casalone *et al.*, 1998). Ce comportement a aussi été observé pour GSTF3 et F7 chez le peuplier (voir article 2), l'activité dépendante de la sérine des GSTF3 et 7 n'est pas ou très modérément impactée par la mutation de la sérine en alanine. L'analyse structurale du site catalytique montre qu'une thréonine adjacente est suffisamment proche pour compenser l'absence de la sérine (figure 53). L'implication de cette thréonine dans le mécanisme réactionnel nécessiterait d'être confirmée par mutagenèse dirigée. La présence récurrente de ce résidu pèse en faveur de l'importance de ce résidu puisque près de la moitié des 400 séquences utilisées pour effectuer l'analyse phylogénétique de cette classe chez les plantes terrestre présente un résidu hydroxylé à cette position, généralement une thréonine. D'autres exemples illustrent la plasticité du site actif chez les GSTs. En effet, l'évolution a conduit à l'apparition, sûrement de manière indépendante, de GSTOs et GSTLs (des GSTs à cystéines catalytiques) possédant une sérine au lieu de la cystéine. Pour des GSTOs de champignon, ce changement concorde comme attendu avec l'acquisition d'une activité de glutathionylation et la perte de l'activité de déglutathionylation (Mélanie Morel-Rouhier, Eric Gelhaye, communication personnelle). L'histoire évolutive des GSTs s'avère donc complexe et plusieurs exemples montrent que la délimitation séparant les GSTs à sérine et cystéine catalytique est régulièrement franchie par les enzymes des deux types.

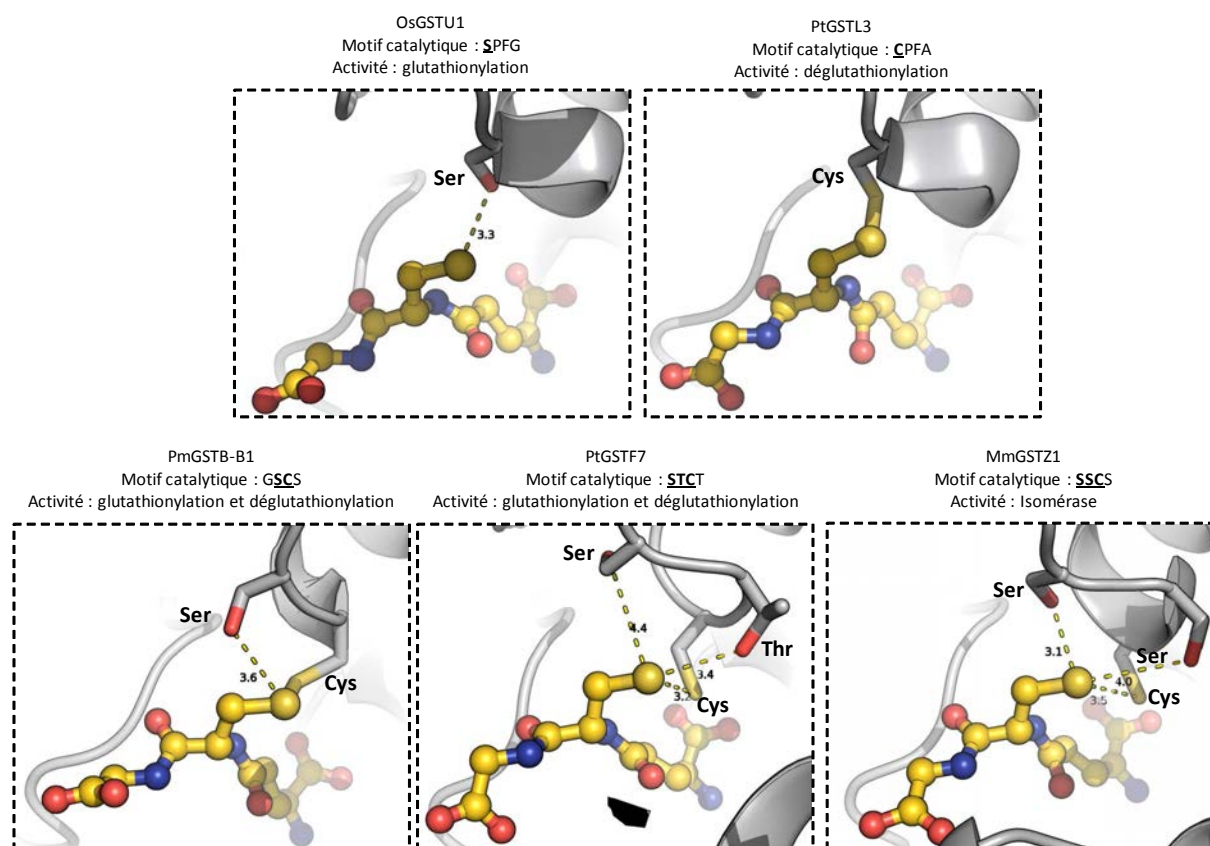


Figure 53 : Plasticité du site catalytique chez les GSTs. Les sites actifs typiques de GST à sérine et cystéine catalytiques sont représentés par la GSTU1 de *Oryza sativa* (code PDB = 1OYJ) et la GSTL3 de *P. trichocarpa* (code PDB = 4PQI). Les sites actifs de GSTs présentant une cystéine et des résidus hydroxylés sont représentés par la GSTB-B1 de *P. mirabilis* (code PDB = 1PMT), la GSTF7 de *P. trichocarpa* et la GSTZ1 de *Mus musculus* (code PDB = 2CZ2). Le motif catalytique ainsi que les principales activités associées à ces enzymes sont indiqués. Les distances en angström (Å) entre le groupement thiol de la cystéine du glutathion et les résidus d'intérêt sont indiquées, un pont disulfure constituant une distance de 2 Å.

11. Fonctions cellulaires des GSTFs

Le rôle des GSTs, et particulièrement des GSTFs dans la détoxification cellulaire de xénobiotiques tels que les herbicides n'est plus à démontrer (Neuefeind *et al.*, 1997, Edwards *et al.*, 2000, Edwards *et al.*, 2005, Cummins *et al.*, 2011). Cependant les GSTFs et leurs fonctions de détoxification n'ont pas évolué pour métaboliser des composés synthétiques existant depuis 60 ans à peine. Il est donc raisonnable de supposer que ce rôle est une extension de leurs fonctions naturelles. Ces xénobiotiques sont conjugués et séquestrés dans la vacuole. Ceux-ci ont pu être identifiés en raison de la stabilité des conjugués issus de substitutions nucléophiles irréversibles. En revanche très peu de composés endogènes glutathionylés ont été identifiés, bien que l'étude des GSTs de plantes ait débuté il y plus de 40 ans. Une explication couramment proposée est que ces composés glutathionylés seraient

formés en petite quantité. De plus, ceux issus d'une addition de Michael réversible peuvent perdre l'adduit glutathion dans certaines conditions, par exemple lors d'extraction de métabolites. D'ailleurs, les composés glutathionylés intermédiaires et instables formés dans les voies métaboliques bien décrites présentes chez les plantes et les animaux du glyoxylate (S-lactoylglutathion) ou des composés à un carbone (S-formylglutathion) sont très difficiles à détecter (Dixon *et al.*, 1998). Il n'est donc pas surprenant que ces molécules naturelles glutathionylées soient difficiles à identifier. D'autre part, les conjugués glutathionylés sont rapidement transformés. C'est ce que montre une étude chez *A. thaliana* où des lignées mutantes de certaines γ -glutamyl peptidases, des enzymes capables de cliver la liaison gamma particulière du glutathion, accumulent des composés glutathionylés (Geu-Flores *et al.*, 2009, Geu-Flores *et al.*, 2011). La suppression de l'expression de γ -glutamyl peptidases a d'ailleurs permis d'identifier que la GSTF6 d'*A. thaliana* est requise pour la synthèse du composé de défense camalexine en conjuguant du glutathion sur l'indole-3-acetonitrile, un intermédiaire de synthèse (Su *et al.*, 2011). L'utilisation de la génétique inverse constitue en général un outil puissant pour déchiffrer le rôle de gènes/protéines candidats. Toutefois, cette approche reste limitée dans le cas de familles multigéniques du fait de l'existence d'une relative redondance entre protéines et classes de protéines comme démontré ci-dessus. A cet égard, l'extinction génique de 4 GSTFs chez *A. thaliana* n'entraîne pas de phénotypes particuliers à part quelques modifications du niveau de certains métabolites, illustrant la redondance fonctionnelle de ces enzymes et/ou leurs rôles non vitaux (Sappl *et al.*, 2009). Cependant, par cette méthode, il a été montré qu'un groupe de GSTFs très conservées au sein des plantes terrestre est requis pour l'accumulation correcte des anthocyanines dans la vacuole telle que les protéines TT19 d'*A. thaliana* (Kitamura *et al.*, 2004), AN9 de *Petunia hybrida* (Alfenito *et al.*, 1998) et GST4 de *Vitis vinifera* (Gomez *et al.*, 2011). De façon paradoxale, cette même fonction est assurée par la GST tau bz2 chez le maïs qui est d'ailleurs capable de compléter les mutants tt19 et AN9 (Marrs *et al.*, 1995, Alfenito *et al.*, 1998). L'isoforme GSTF8 du peuplier présente un fort degré d'homologie avec ces GSTFs. Ces GSTFs présentent certainement une activité ligandine envers ces molécules puisqu'il a été montré qu'elles ne sont pas sujettes à la glutathionylation (Mueller *et al.*, 2000, Sun *et al.*, 2012). Nous avons testé certaines molécules d'anthocyane par la méthode d'analyse de la thermostabilité des protéines précédemment décrite contre les GSTFs. Les GSTF3, 7 et 8, celles qui présentent une cystéine dans le motif catalytique, sont fortement stabilisées par ces molécules, suggérant une interaction. Cet effet semble dépendre de l'état réduit ou oxydé de ces protéines, c'est-à-dire de la présence ou non d'une molécule de glutathion covalamment

liée dans le sillon catalytique. D'autre part, ces molécules d'anthocyanes entraînent une forte inhibition de l'activité estérase contre la sonde 4-MOA. Cependant, ces résultats n'ont pas été présentés ici puisqu'ils ont été obtenus récemment et qu'ils étaient difficilement reproductibles du fait d'une dégradation rapide de ces molécules et qu'on les possède d'autre part en quantité limitée. Il est prévu de réitérer ces expériences avec de nouveaux stocks de ces molécules et d'explorer également cette interaction par titration calorimétrique isotherme.

Enfin, l'aptitude de certaines GSTFs à réduire certains peroxydes organiques est potentiellement importante pour la cellule notamment en cas de stress. La surexpression de GSTFs ou GSTU présentant cette activité peut accroître considérablement la résistance des plantes à plusieurs stress (Roxas *et al.*, 1997, Cummins *et al.*, 1999, Cummins *et al.*, 2013). Au niveau du métabolisme secondaire, cette activité pourrait être importante en régulant notamment l'abondance des acides gras peroxydés (oxylipines) qui constituent des précurseurs de molécules « signal » importantes. Il est donc intéressant de spéculer que les GSTFs et les GSTUs catalysent la réduction de bon nombre de molécules oxydées, appartenant notamment au métabolisme secondaire, et que ce rôle est sous-apprécié en raison de l'absence de méthodes pour détecter les substrats ou les produits de réaction. Nous avons montré dans ce travail que les GSTF1, 3 et 7 présentent une activité peroxydase importante, suggérant une implication dans ce type de fonction.

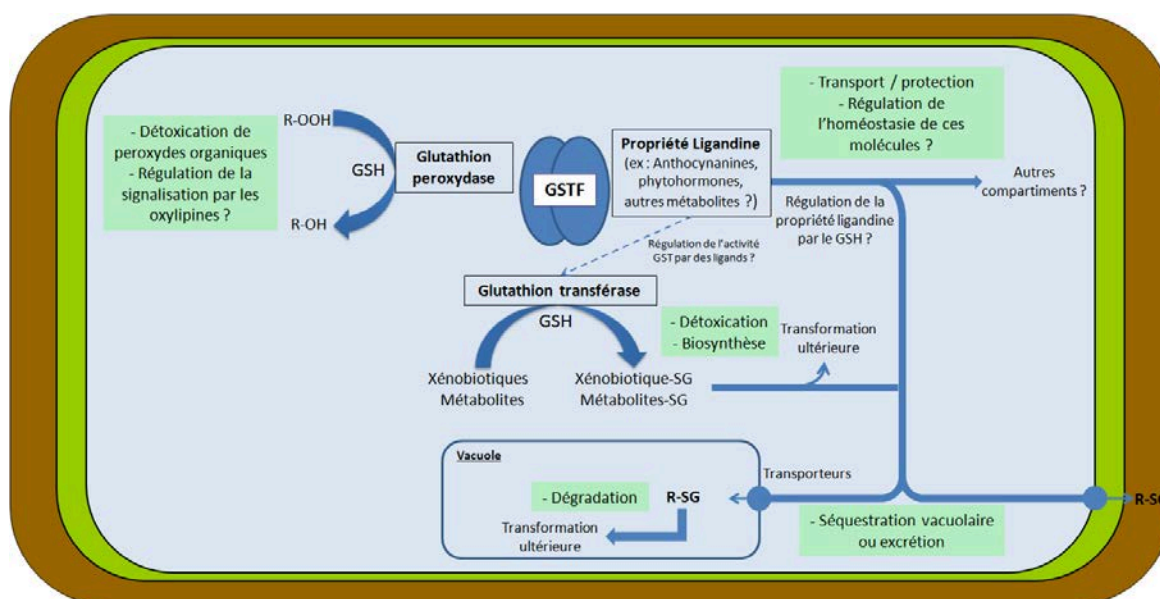


Figure 54 : Aperçu des fonctions cellulaires des GSTFs. Les rôles cellulaires des GSTFs associés à leurs activités glutathion transférase et peroxydase ainsi qu'à leur propriété ligandine sont représentés schématiquement.

12. Vers l'identification et la caractérisation des substrats des GSTFs

Une autre approche pour comprendre les fonctions biologiques et physiologiques des enzymes est d'identifier directement leurs substrats. Cependant, la plupart des ligands/substrats des GSTs identifiées et caractérisées à ce jour demeurent inconnus alors que c'est une étape cruciale pour mieux appréhender les rôles de ces enzymes. Plusieurs stratégies *in vitro* et *in vivo* sont envisageables pour isoler, purifier et identifier les substrats physiologiques naturels d'une enzyme. Certaines méthodes ont déjà prouvé leur efficacité lors de la caractérisation de certaines GSTUs d'*A. thaliana* qui lient des intermédiaires de porphyrines (Dixon *et al.*, 2008) et d'acides gras (Dixon *et al.*, 2009) ou de GSTs lambda d'*A. thaliana* ou de blé qui lient des flavonoïdes (Dixon *et al.*, 2010). L'approche par isolement de ligands *in vitro* a été choisie puisqu'elle permet de tirer avantage des protéines recombinantes déjà produites et purifiées.

Les GSTFs de peuplier sont des protéines *a priori* cytosoliques dont les gènes sont préférentiellement exprimés dans les feuilles, les fleurs femelles et les bourgeons et c'est donc ces organes qui ont été choisis pour l'extraction de métabolites. L'extraction des métabolites a été réalisée par extraction continue à l'aide d'un appareil de Soxhlet. Cette technique constitue une méthode de choix permettant de recueillir une gamme importante de métabolites à partir de quantités modérées d'échantillon, tout en limitant les quantités de solvants utilisés.

Cependant, cette méthode nécessite un chauffage continu du solvant pouvant engendrer une dénaturation précoce des métabolites extraits. Pour contourner ce problème de dénaturation thermique, une macération méthanolique à froid a également été réalisée. D'autres méthodes d'extraction spécifiques à des classes de composés auraient pu être utilisées. A titre d'exemple, les alcaloïdes peuvent être extraits à l'aide d'acétate d'éthyle (Jones *et al.*, 2012). L'analyse de la composition chimique des extraits a révélé une hétérogénéité et une diversité des molécules extraites selon le type d'organes et de solvants utilisés. Cette composition chimique, notamment au niveau des bourgeons, est semblable à celle obtenue au cours d'études menées sur d'autres espèces de peupliers du genre *Populus*. On y retrouve de nombreux composés aromatiques tels le syringaldéhyde (Greenaway *et al.*, 1988), des flavonoïdes telles la naringénine (Greenaway *et al.*, 1991), des chalcones (English *et al.*, 1991) et de nombreux terpènes comme le β -eudesmol (Jerković *et al.*, 2003). En revanche dans notre travail, il a été plus difficile d'identifier des flavonoïdes à partir des organes reproducteurs et foliaires, composés pourtant présents chez une espèce du genre *Salix* appartenant à la famille des Salicacées dont font également partie les peupliers (Enayat *et al.*, 2009).

Dans le but d'identifier des molécules susceptibles d'interagir avec les GSTFs de peuplier, deux méthodes de criblage ont été mises en œuvre. La première a consisté à analyser la thermostabilité des protéines en présence de ligands potentiels issus d'extraits ou d'une banque de molécules chimiques alors que la seconde est basée sur l'effet de ces mêmes molécules/extraits sur l'activité estérase de ces GSTFs. La première méthode mettra plutôt en évidence une interaction de type protéine-ligand et donc la propriété ligandine des GSTs alors que la seconde méthode, complémentaire, rendra plutôt compte d'un effet inhibiteur (ou activateur) sur l'activité catalytique de la protéine étudiée.

La première méthode dite de « Fluorescence-based Thermal Shift Assay » présente de nombreux intérêts. Elle est notamment très utilisée pour déterminer les conditions optimales de stabilité d'une protéine en testant différentes gammes de tampons, de pH ou de concentrations en NaCl (Boivin *et al.*, 2013). Ces conditions de stabilité, une fois appréhendées, seront le point de départ de la caractérisation structurale de la protéine étudiée notamment en ce qui concerne l'étape de cristallogénèse. Les deux méthodes ont été utilisées pour cribler des extraits ainsi que différentes molécules. Dans l'ensemble, les plus forts déplacements thermiques ont été retrouvés pour la GSTF7 et 3. Pour ces tests, ces deux GSTFs présentaient un adduit glutathion lié de façon covalente à la cystéine présente dans le

site actif. A l'avenir, il serait intéressant de poursuivre la caractérisation biochimique de ces enzymes en les utilisant dans un état réduit, *i.e.* sans glutathion dans le site actif. En effet, il a été montré que la présence de glutathion augmentait l'affinité de liaison d'une GSTF d'*A. thaliana* pour certains ligands (Dixon *et al.*, 2011). De façon intéressante, l'extrait aqueux de fleurs femelles a montré des variations thermiques importantes pour GSTF1 et 2. Un fractionnement de l'extrait à l'eau de fleurs femelles de peuplier a montré des résultats encourageants avec l'une des fractions obtenues. La méthode de criblage de substrats par déplacement thermique de la température de fusion nous a donc fourni une première indication sur les molécules susceptibles d'être prises en charge par les GSTFs. Néanmoins, cette méthode présente quelques limites. Il a par exemple été impossible de déterminer la température de fusion des GSTFs envers quelques extraits notamment ceux obtenus à partir des bourgeons. Les résultats issus de cette technique pourraient être traités statistiquement et plus finement par des analyses en composantes principales (ACP) de manière à préciser la spécificité des molécules à l'égard d'une GSTF ou d'un groupe de GSTFs étudiées au cours de ce travail.

Notre choix s'est ensuite porté sur des tests de compétition enzymatique. Le CDNB ou le PNP-butyrate auraient pu constituer des substrats appropriés pour une mesure de l'activité glutathion transférase en raison de la relativement bonne affinité des GSTFs envers ces substrats. Cependant, si une des molécules/extraites testées présente un pic d'absorption aux environs de 400 nm, la mesure de l'activité glutathion transférase serait compliquée car la glutathionylation du CDNB et du PNP-butyrate est mesurée à 340 et à 412 nm respectivement. Nous avons donc choisi de mesurer une activité estérase en présence de 4-MOA qui émet une fluorescence à 460 nm après excitation à 355 nm. Cette méthode permet de contourner le problème lié aux molécules présentant des bandes d'absorbance situées aux environs de 300 et 400 nm. En effet, peu de métabolites sont susceptibles d'émettre de la fluorescence autour de 500 nm d'où notre intérêt pour cette méthode, les molécules/extraites testées n'interféreront donc pas avec le signal de fluorescence de la 4-méthylombelliférone. Cette seconde méthode n'a été cependant appliquée qu'à GSTF1 par manque de temps. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont notamment montré une inhibition importante de l'activité estérase de cette enzyme en présence de certaines fractions issues du fractionnement de l'extrait à l'eau de fleurs femelles.

Toutefois, un autre paramètre est à prendre en compte lors des criblages d'extraits ou de molécules chimiques spécifiques des GSTs. En effet, dans le contexte cellulaire, certaines

molécules nécessitent une activation précédant leur catalyse par les GSTs. Cette activation peut avoir lieu de différentes manières même si la plus documentée est celle réalisée par les cytochromes P450 monooxygénases. Cette activation des molécules et extraits par des enzymes de phase I pourrait s'avérer nécessaire avant criblage. A titre d'exemple, les GSTs humaines de la classe mu effectuent des réactions de conjugaison du glutathion sur des catécholamines qui nécessitent une oxydation préalable (Baez *et al.*, 1997).

Les résultats obtenus, qui restent encore préliminaires, sont néanmoins encourageants et devront être confirmés par d'autres approches. En premier lieu, il sera nécessaire de préciser le type d'interaction (protéine-ligand ou protéine-substrat/inhibiteur), de définir avec précision le site de fixation de la molécule identifiée au niveau de la protéine (site G, site H ou L) et de déterminer le type d'inhibition dans le cas de l'identification d'une molécule inhibitrice. Bien que les méthodes de thermostabilité des protéines et d'inhibition d'activité permettent déjà de donner des informations quant au type d'interaction, ce dernier pourra être confirmé par un criblage des ligands/substrats identifiés par des méthodes de compétition en présence de sondes fluorescentes telles que la CMFDA (5-chlorométhylfluorescéine diacétate) ou l'ANS (acide 8-anilino-1-naphthalène sulfonique) (Weerapana *et al.*, 2010), sondes se fixant respectivement au niveau des sites G et H de certaines GSTs. L'interaction d'une protéine avec un substrat ou ligand pourra être détectée par l'analyse de la variation de la fluorescence qui reflète la capacité des sondes à entrer en compétition avec les substrats ou ligands interagissant avec la protéine étudiée. Ces sondes ont déjà montré leur efficacité lors de travaux précédents réalisés sur des GSTs d'autres classes (Mathieu *et al.*, 2012, Mathieu *et al.*, 2013, Lallement *et al.*, 2014). Par ailleurs l'affinité d'une GSTF pour les substrats ou ligands identifiés pourra être déterminée par titration calorimétrique isotherme. Comme cela a été décrit dans l'introduction, les GSTs présentent des sites ligandine dédiés au transport ou au stockage de divers ligands non-substrats, comme par exemple des composés de dégradation du bois dans le cas des GSTs fongiques (Mamathambika *et al.*, 2008, Mathieu *et al.*, 2012, Mathieu *et al.*, 2013). La situation pourrait être encore plus complexe pour les GSTFs puisque deux sites ligandine différents ont été caractérisés pour la GSTF2 d'*A. thaliana* (Reinemer *et al.*, 1996, Smith *et al.*, 2003). De plus, lorsque cette GSTF2 est en complexe avec certains ligands, son affinité pour d'autres ligands est non seulement augmentée mais son activité glutathion transférase est aussi accrue de 60% (Dixon *et al.*, 2011). La formation d'un complexe ligand-protéine permettrait donc de moduler à la fois son affinité pour d'autres ligands mais également son activité catalytique. L'obtention de

structures tridimensionnelles de complexes ligand/substrat-GST permettrait sans doute de cartographier et de décrire précisément les sites de liaison de chaque GSTF et d'aider à interpréter les résultats des expériences de criblage de substrats et de ligands. En particulier, nous devrions être en mesure de distinguer des fonctions catalytiques ou « ligandine » pour chaque GSTF de peuplier. Une attention particulière sera donc portée à la poursuite des analyses structurales des GSTs phi de peuplier qui ont déjà contribué à la résolution des structures des GSTF1, 2, 5, 7 et 8. Ces GSTFs seront donc ciblées en priorité. Il sera possible d'effectuer des co-cristallisations ou des trempages de cristaux de protéines en présence de ligand, de substrat ou d'inhibiteur.

Enfin, nous comptons également mettre en œuvre très prochainement une méthode mise au point récemment et dénommée « identification bi-orthogonale de substrats » (Feng *et al.*, 2014). Cette méthode, couplée à une phase préalable d'oxydation par l'intermédiaire des microsomes (comportant les CYP450 « enzymes de phase I »), pour le moins originale et innovante, a donné des résultats encourageants lors de l'identification des substrats de la GSTM1 (GST de la classe mu) du ver plat *Schistosoma japonicum* à partir d'un mélange d'herbes médicinales chinoises. Brièvement, cette méthode nécessite la synthèse préalable d'une molécule analogue au GSH (GSH-R) qui consiste à conjuguer un groupe terminal alkyle (-R) à la glycine d'une molécule de GSH (γ -Glu-Cys-Gly) permettant ainsi sa biotinylation ultérieure par un réactif de type azido-biotine. Cette méthode nécessite également la production d'une protéine recombinante modifiée lui permettant d'accepter le glutathion modifié du fait de son encombrement stérique plus important, notamment au niveau de sa glycine. Un substrat potentiel glutathionylé par ce GSH-R en présence de la GST modifiée pourra être biotinylé et enrichi à l'aide d'une chromatographie d'affinité sur une résine streptavidine. Cette étape d'enrichissement facilitera l'identification des molécules cibles glutathionylées par la GST, étape généralement délicate du fait de leurs faibles concentrations dans un extrait. Cette stratégie sera appliquée prochainement à la protéine GSTF1, protéine pour laquelle trois variants ont été produits afin d'accepter ce glutathion modifié. Cependant, la synthèse du glutathion est toujours en cours. Celle-ci est relativement complexe et comprend plusieurs étapes de synthèse. Cette approche sera poursuivie ultérieurement.

Références

Achilonu, I., et al. (2010). "The role of a topologically conserved isoleucine in glutathione transferase structure, stability and function." Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications **66**(7): 776-780.

Alfenito, M. R., et al. (1998). "Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases." Plant Cell **10**(7): 1135-1149.

Anandarajah, K., et al. (2000). "Recruitment of a double bond isomerase to serve as a reductive dehalogenase during biodegradation of pentachlorophenol." Biochemistry **39**(18): 5303-5311.

Apel, K. and H. Hirt (2004). "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction." Annu. Rev. Plant Biol. **55**: 373-399.

Armbruster, U., et al. (2009). "Chloroplast proteins without cleavable transit peptides: rare exceptions or a major constituent of the chloroplast proteome?" Mol Plant **2**(6): 1325-1335.

Armstrong, R. N. (1997). "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases." Chem Res Toxicol **10**(1): 2-18.

Asada, K. (2006). "Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions." Plant Physiol **141**(2): 391-396.

Atkinson, H. J. and P. C. Babbitt (2009). "An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations." PLoS Comput Biol **5**(10): e1000541.

Awasthi, Y. C., et al. (2004). "Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases." Free Radical Biology and Medicine **37**(5): 607-619.

Axarli, I., et al. (2009). "Crystal structure of Glycine max glutathione transferase in complex with glutathione: investigation of the mechanism operating by the Tau class glutathione transferases." Biochem J **422**(2): 247-256.

Axarli, I., et al. (2009). "Crystallographic and functional characterization of the fluorodifen-inducible glutathione transferase from Glycine max reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site." J Mol Biol **385**(3): 984-1002.

Baez, S., et al. (1997). "Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes." Biochem J **324** (Pt 1): 25-28.

Baier, M. and K. J. Dietz (1996). "Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases." Plant Mol Biol **31**(3): 553-564.

Bailly, X., et al. (2008). "A phylogenomic profile of hemerythrins, the nonheme diiron binding respiratory proteins." BMC Evol Biol **8**: 244.

Beck, A., et al. (2003). "Phytochelatase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates." Phytochemistry **62**(3): 423-431.

Bedhomme, M., et al. (2009). "Regulation by glutathionylation of isocitrate lyase from *Chlamydomonas reinhardtii*." J Biol Chem **284**(52): 36282-36291.

Begas, P., et al. (2015). "Systematic re-evaluation of the bis (2-hydroxyethyl) disulfide (HEDS) assay reveals an alternative mechanism and activity of glutaredoxins." Chemical Science.

Belchik, S. M. and L. Xun (2011). "S-glutathionyl-(chloro) hydroquinone reductases: a new class of glutathione transferases functioning as oxidoreductases." Drug Metab Rev **43**(2): 307-316.

Bender, K. W., et al. (2015). "Glutaredoxin AtGRXC2 catalyses inhibitory glutathionylation of Arabidopsis BRI1-associated receptor-like kinase 1 (BAK1) in vitro." Biochem J **467**(3): 399-413.

Benekos, K., et al. (2010). "Overexpression of a specific soybean GmGSTU4 isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants." J Biotechnol **150**(1): 195-201.

Bergeron, F., et al. (2010). "HO* radicals induce an unexpected high proportion of tandem base lesions refractory to repair by DNA glycosylases." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(12): 5528-5533.

Biteau, B., et al. (2003). "ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin." Nature **425**(6961): 980-984.

Block, A., et al. (2005). "Coronatine and salicylic acid: the battle between Arabidopsis and Pseudomonas for phytohormone control." Mol Plant Pathol **6**(1): 79-83.

Board, P. G., et al. (2000). "Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases." J Biol Chem **275**(32): 24798-24806.

Board, P. G., et al. (2003). "Clarification of the role of key active site residues of glutathione transferase zeta/maleylacetoacetate isomerase by a new spectrophotometric technique." Biochem J **374**(Pt 3): 731-737.

Boivin, S., et al. (2013). "Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens." Protein expression and purification **91**(2): 192-206.

Booth, J., et al. (1961). "An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione." Biochem J **79**(3): 516-524.

Bowler, C., et al. (1994). "Superoxide dismutase in plants." Critical Reviews in Plant Sciences **13**(3): 199-218.

Brentner, L. B., et al. (2008). "Expression of glutathione S-transferases in poplar trees (*Populus trichocarpa*) exposed to 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)." Chemosphere **73**(5): 657-662.

Brot, N., et al. (1981). "Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(4): 2155-2158.

Bruns, C. M., et al. (1999). "Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products." J Mol Biol **288**(3): 427-439.

Buetler, T. M. and D. L. Eaton (1992). "Glutathione S-transferases: Amino acid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship." Journal of Environmental Science & Health Part C **10**(2): 181-203.

Burow, M., et al. (2008). Sulfur-containing secondary metabolites and their role in plant defense. Sulfur metabolism in phototrophic organisms, Springer: 201-222.

Caccuri, A. M., et al. (2002). "GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*: a snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme." J Biol Chem **277**(21): 18777-18784.

Cai, M. and L. Xun (2002). "Organization and regulation of pentachlorophenol-degrading genes in *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723." J Bacteriol **184**(17): 4672-4680.

Cai, M. and L. Xun (2002). "Organization and regulation of pentachlorophenol-degrading genes in *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723." J Bacteriol **184**(17): 4672-4680.

Casalone, E., et al. (1998). "Site-directed mutagenesis of the *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1 G-site." FEBS Lett **423**(2): 122-124.

Chen, J. H., et al. (2012). "Drought and salt stress tolerance of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid." Plant Physiol **158**(1): 340-351.

Cheng, K. C., et al. (1992). "8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions." J Biol Chem **267**(1): 166-172.

Chew, O., et al. (2003). "Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants." J Biol Chem **278**(47): 46869-46877.

Coleman, J., et al. (1997). "Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation." Trends Plant Sci **2**(4): 144-151.

Collinson, E. J., et al. (2002). "The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases." J Biol Chem **277**(19): 16712-16717.

Combes, B. and G. S. Stakelum (1961). "A LIVER ENZYME THAT CONJUGATES SULFOBROMOPHTHALEIN SODIUM WITH GLUTATHIONE." Journal of Clinical Investigation **40**(6): 981-988.

Cooper, C. E., et al. (2002). "Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species." Trends Biochem Sci **27**(10): 489-492.

Couturier, J., et al. (2013). "Toward a refined classification of class I dithiol glutaredoxins from poplar: biochemical basis for the definition of two subclasses." Front Plant Sci **4**: 518.

Cummins, I., et al. (2009). "Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*)." Plant Biotechnol J **7**(8): 807-820.

Cummins, I., et al. (1997). "Purification of Multiple Glutathione Transferases Involved in Herbicide Detoxification from Wheat (*Triticum aestivum*L.) Treated with the Safener Fenchlorazole-ethyl." Pesticide Biochemistry and Physiology **59**(1): 35-49.

Cummins, I., et al. (1999). "A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass." Plant J **18**(3): 285-292.

Cummins, I., et al. (2011). "Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification." Drug Metab Rev **43**(2): 266-280.

Cummins, I., et al. (2003). "Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat." Plant Mol Biol **52**(3): 591-603.

Cummins, I., et al. (2013). "Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(15): 5812-5817.

Davies, M. J. (1996). "Protein and peptide alkoxyl radicals can give rise to C-terminal decarboxylation and backbone cleavage." Arch Biochem Biophys **336**(1): 163-172.

de Rey-Pailhade, J. (1888). "Sur un corps d'origine organique hydrogéné le soufre à froid." CR Acad Sci **106**: 1683-1684.

de Rey-Pailhade, J. (1894). "études sur les propriétés chimiques de l'extrait alcoolique de levure de bière; formation de l'acide carbonique et absorption d'oxygène." Compt. rend. des séances de l'académie des sciences **118**: 201.

Deby-Dupont, G., et al. (2002). "Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène." Réanimation **11**(1): 28-39.

del Rio, L. A., et al. (2006). "Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling." Plant Physiol **141**(2): 330-335.

Delattre, J., et al. (2005). "Radicaux libres et stress oxydant(aspects biologiques et pathologiques)."

Delker, C., et al. (2006). "Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*--enzymes, products, regulation." Plant Biol (Stuttg) **8**(3): 297-306.

Demmig-Adams, B. (1990). "Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics **1020**(1): 1-24.

Deng, F. and K. K. Hatzios (2002). "Characterization and safener induction of multiple glutathione S-transferases in three genetic lines of rice." Pesticide Biochemistry and Physiology **72**(1): 24-39.

Deponte, M. (2013). "Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes." Biochim Biophys Acta **1830**(5): 3217-3266.

DeRidder, B. P., et al. (2002). "Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners." Plant Physiol **130**(3): 1497-1505.

Dickinson, D. A. and H. J. Forman (2002). "Cellular glutathione and thiols metabolism." Biochem Pharmacol **64**(5-6): 1019-1026.

Dietz, K. J. (2011). "Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria." Antioxid Redox Signal **15**(4): 1129-1159.

Dirr, H., et al. (1994). "X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function." Eur J Biochem **220**(3): 645-661.

Dixon, D. P., et al. (1998). "Glutathione-mediated detoxification systems in plants." Curr Opin Plant Biol **1**(3): 258-266.

Dixon, D. P. and R. Edwards (2009). "Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases." J Biol Chem **284**(32): 21249-21256.

Dixon, D. P. and R. Edwards (2010). "Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing." Journal of Biological Chemistry **285**(47): 36322-36329.

Dixon, D. P. and R. Edwards (2010). "Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing." J Biol Chem **285**(47): 36322-36329.

Dixon, D. P., et al. (2009). "Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily." J Exp Bot **60**(4): 1207-1218.

Dixon, D. P., et al. (2002). "Plant glutathione transferases." Genome Biol **3**(3): REVIEWS3004.

Dixon, D. P., et al. (2008). "Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases." J Biol Chem **283**(29): 20268-20276.

Dixon, D. P., et al. (2003). "Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase." J Biol Chem **278**(26): 23930-23935.

Dixon, D. P., et al. (2011). "The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands." Biochem J **438**(1): 63-70.

Dixon, D. P., et al. (2010). "Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism." Phytochemistry **71**(4): 338-350.

- Dixon, D. P., et al. (2011). "Roles for glutathione transferases in antioxidant recycling." Plant Signal Behav **6**(8): 1223-1227.
- Droog, F. (1997). "Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau." Journal of Plant Growth Regulation **16**(2): 95-107.
- Droog, F. N., et al. (1995). "2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated type-III tobacco glutathione S-transferases." Plant Physiol **107**(4): 1139-1146.
- Dueholm, B., et al. (2015). "Evolution of substrate recognition sites (SRSs) in cytochromes P450 from Apiaceae exemplified by the CYP71AJ subfamily." BMC Evol Biol **15**: 122.
- Edwards, R., et al. (2005). "Chemical manipulation of antioxidant defences in plants." Advances in botanical research **42**: 1-32.
- Edwards, R. and D. P. Dixon (2005). "Plant glutathione transferases." Methods Enzymol **401**: 169-186.
- Edwards, R., et al. (2000). "Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health." Trends Plant Sci **5**(5): 193-198.
- Edwards, T. E., et al. (2011). "Structures of a putative zeta-class glutathione S-transferase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **67**(Pt 9): 1038-1043.
- Enayat, S. and S. Banerjee (2009). "Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp." Food Chem **116**(1): 23-28.
- English, S., et al. (1991). "Analysis of phenolics of *Populus trichocarpa* bud exudate by GC-MS." Phytochemistry **30**(2): 531-533.
- Epp, O., et al. (1983). "The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution." Eur J Biochem **133**(1): 51-69.
- Fang, T., et al. (2011). "Identification and clarification of the role of key active site residues in bacterial glutathione S-transferase zeta/maleylpyruvate isomerase." Biochem Biophys Res Commun **410**(3): 452-456.
- Farmer, E. E., et al. (2003). "Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory." Curr Opin Plant Biol **6**(4): 372-378.

Feng, S., et al. (2014). "Substrate profiling of glutathione S-transferase with engineered enzymes and matched glutathione analogues." Angew Chem Int Ed Engl **53**(28): 7149-7153.

Fernández-Cañón, J. M. and M. A. Peñalva (1998). "Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue." Journal of Biological Chemistry **273**(1): 329-337.

Feussner, I. and C. Wasternack (2002). "The lipoxygenase pathway." Annu Rev Plant Biol **53**(1): 275-297.

Foreman, J., et al. (2003). "Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth." Nature **422**(6930): 442-446.

Foyer, C. H. and G. Noctor (2005). "Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context." Plant, Cell & Environment **28**(8): 1056-1071.

Foyer, C. H. and G. Noctor (2009). "Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications." Antioxid Redox Signal **11**(4): 861-905.

Foyer, C. H. and G. Noctor (2011). "Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub." Plant Physiol **155**(1): 2-18.

Frear, D. and H. Swanson (1970). "Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: Partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn." Phytochemistry **9**(10): 2123-2132.

Frova, C. (2006). "Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives." Biomol Eng **23**(4): 149-169.

Fu, J. H., et al. (1991). "Crystals of isoenzyme 3-3 of rat liver glutathione S-transferase with and without inhibitor." Acta Crystallogr B **47** (Pt 5): 813-814.

Fu, S., et al. (1995). "Structural identification of valine hydroperoxides and hydroxides on radical-damaged amino acid, peptide, and protein molecules." Free Radic Biol Med **19**(3): 281-292.

Galle, A., et al. (2009). "Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit." J Plant Physiol **166**(17): 1878-1891.

Geu-Flores, F., et al. (2011). "Cytosolic gamma-glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in Arabidopsis." Plant Cell **23**(6): 2456-2469.

Geu-Flores, F., et al. (2009). "Glucosinolate engineering identifies a gamma-glutamyl peptidase." Nat Chem Biol **5**(8): 575-577.

Giles, N. M., et al. (2003). "Multiple roles of cysteine in biocatalysis." Biochem Biophys Res Commun **300**(1): 1-4.

Glawischnig, E. (2007). "Camalexin." Phytochemistry **68**(4): 401-406.

Glombitza, S., et al. (2004). "Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism." Plant Mol Biol **54**(6): 817-835.

Glombitza, S., et al. (2004). "Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism." Plant Mol Biol **54**(6): 817-835.

Gomez, C., et al. (2011). "In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST." Plant J **67**(6): 960-970.

Gravina, S. A. and J. J. Mieyal (1993). "Thioltransferase is a specific glutathionyl mixed-disulfide oxidoreductase." Biochemistry **32**(13): 3368-3376.

Greenaway, W., et al. (1991). "Analysis of phenolics of bud exudate of *Populus sieboldii* by GC-MS." Phytochemistry **30**(9): 3005-3008.

Greenaway, W., et al. (1988). "Phenolic analysis of bud exudate of *Populus lasiocarpa* by GC/MS." Phytochemistry **27**(11): 3513-3515.

Grill, E., et al. (1989). "Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase)." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(18): 6838-6842.

Gronwald, J. W. and K. L. Plaisance (1998). "Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from sorghum." Plant Physiol **117**(3): 877-892.

Gu, S. X., et al. (2015). "Regulation of thrombosis and vascular function by protein methionine oxidation." Blood **125**(25): 3851-3859.

Guddat, L. W., et al. (1998). "Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization." Structure **6**(6): 757-767.

Habig, W. H., et al. (1974). "The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(10): 3879-3882.

Hallé, F. and P. Lieutaghi (2008). Aux origines des plantes.*. Des plantes anciennes à la botanique du XXI^e siècle, Fayard.

Halliwell, B. (2005). "Free radicals and other reactive species in disease." eLS.

Harington, C. R. and T. H. Mead (1935). "Synthesis of glutathione." Biochemical Journal **29**(7): 1602.

Harms, H., et al. (2011). "Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals." Nat Rev Microbiol **9**(3): 177-192.

Hatton, P. J., et al. (1996). "Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species." Pesticide Science **46**(3): 267-275.

Hayes, J. D., et al. (2005). "Glutathione transferases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **45**: 51-88.

Hegazy, U. M., et al. (2004). "Functional role of the lock and key motif at the subunit interface of glutathione transferase p1-1." J Biol Chem **279**(10): 9586-9596.

Henmi, K., et al. (2005). "Change in the redox state of glutathione regulates differentiation of tracheary elements in Zinnia cells and Arabidopsis roots." Plant Cell Physiol **46**(11): 1757-1765.

Holm, P. J., et al. (2006). "Structural basis for detoxification and oxidative stress protection in membranes." J Mol Biol **360**(5): 934-945.

Holmgren, A., et al. (1975). "Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution." Proceedings of the National Academy of Sciences **72**(6): 2305-2309.

Hopkins, F. G. (1921). "On an autoxidisable constituent of the cell." Biochemical Journal **15**(2): 286.

Ishikawa, T., et al. (1997). "The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function, and gene expression." Biosci Rep **17**(2): 189-207.

Ito, H., et al. (2003). "The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: detection using biotinylated glutathione." Plant Cell Physiol **44**(7): 655-660.

Jakobsson, P. J., et al. (1997). "Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependent transferase and peroxidase activities." J Biol Chem **272**(36): 22934-22939.

Jakobsson, P. J., et al. (2000). "Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily." Am J Respir Crit Care Med **161**(2 Pt 2): S20-24.

Jansson, S. and C. J. Douglas (2007). "Populus: a model system for plant biology." Annu Rev Plant Biol **58**: 435-458.

Jerković, I. and J. Mastelić (2003). "Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L.(Salicaceae)." Phytochemistry **63**(1): 109-113.

Jha, B., et al. (2011). "Expression of SbGSTU (tau class glutathione S-transferase) gene isolated from *Salicornia brachiata* in tobacco for salt tolerance." Mol Biol Rep **38**(7): 4823-4832.

Jiang, H. W., et al. (2010). "A glutathione S-transferase regulated by light and hormones participates in the modulation of *Arabidopsis* seedling development." Plant Physiol **154**(4): 1646-1658.

Jones, W. P. and A. D. Kinghorn (2012). Extraction of plant secondary metabolites. Natural Products Isolation, Springer: 341-366.

Jowsey, I. R., et al. (2003). "Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase." Biochem J **373**(Pt 2): 559-569.

Kaiser, W. M. (1979). "Reversible inhibition of the calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide." Planta **145**(4): 377-382.

Katie, L., et al. (2014). "Structural and mechanistic insights into an extracytoplasmic copper trafficking pathway in *Streptomyces lividans*." Biochemical Journal **459**(3): 525-538.

- Keppler, D. (1999). "Export pumps for glutathione S-conjugates." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 985-991.
- Kiefer, P. M., Jr. and S. D. Copley (2002). "Characterization of the initial steps in the reductive dehalogenation catalyzed by tetrachlorohydroquinone dehalogenase." Biochemistry **41**(4): 1315-1322.
- Kim, S. O., et al. (2002). "OxyR: a molecular code for redox-related signaling." Cell **109**(3): 383-396.
- Kitamura, S., et al. (2010). "Metabolic profiling and cytological analysis of proanthocyanidins in immature seeds of Arabidopsis thaliana flavonoid accumulation mutants." Plant J **62**(4): 549-559.
- Kitamura, S., et al. (2004). "TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis." Plant J **37**(1): 104-114.
- Klein, M. and J. Papenbrock (2004). "The multi-protein family of Arabidopsis sulphotransferases and their relatives in other plant species." J Exp Bot **55**(404): 1809-1820.
- Koh, C. S., et al. (2008). "An atypical catalytic mechanism involving three cysteines of thioredoxin." J Biol Chem **283**(34): 23062-23072.
- Kolm, R. H., et al. (1992). "Participation of the phenolic hydroxyl group of Tyr-8 in the catalytic mechanism of human glutathione transferase P1-1." Biochem J **285** (Pt 2): 537-540.
- Kong, K. H., et al. (1992). "Tyrosine-7 in human class Pi glutathione S-transferase is important for lowering the pKa of the thiol group of glutathione in the enzyme-glutathione complex." Biochem Biophys Res Commun **184**(1): 194-197.
- Kortemme, T. and T. E. Creighton (1995). "Ionisation of cysteine residues at the termini of model α -helical peptides. Relevance to unusual thiol pK a values in proteins of the thioredoxin family." J Mol Biol **253**(5): 799-812.
- Kunert, K. and C. Foyer (1993). "Thiol/disulphide exchange in plants." Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants. Regulatory Agricultural and Environmental Aspects. SPB Academic Publishers, The Hague, The Netherlands: 139-151.
- Labrou, N. E., et al. (2001). "Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (Zea mays) glutathione S-transferase I." Biochem J **358**(Pt 1): 101-110.

Labrou, N. E., et al. (2015). "Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response." Current opinion in biotechnology **32**: 186-194.

Ladner, J. E., et al. (2004). "Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1." Biochemistry **43**(2): 352-361.

Lallement, P. A., et al. (2014). "The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants." Front Pharmacol **5**: 192.

Lallement, P. A., et al. (2015). "Glutathionyl-hydroquinone reductases from poplar are plastidial proteins that deglutathionylate both reduced and oxidized glutathionylated quinones." FEBS Lett **589**(1): 37-44.

Lallement, P. A., et al. (2014). "Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants." Biochem J **462**(1): 39-52.

Lamoureux, G. L., et al. (1970). "Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections." J Agric Food Chem **18**(1): 81-86.

Lan, T., et al. (2009). "Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family." Plant Cell **21**(12): 3749-3766.

Latowski, D., et al. (2010). "Regulatory Role of Components of Ascorbate–Glutathione Pathway in Plant Stress Tolerance." Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants: 1-53.

Leon, J. (2013). "Role of plant peroxisomes in the production of jasmonic acid-based signals." Subcell Biochem **69**: 299-313.

Li, H., et al. (2003). "Glutathione synthetase homologs encode alpha-L-glutamate ligases for methanogenic coenzyme F420 and tetrahydrosarcinapterin biosyntheses." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9785-9790.

Lieberherr, D., et al. (2003). "The rapid induction of glutathione S-transferases AtGSTF2 and AtGSTF6 by avirulent *Pseudomonas syringae* is the result of combined salicylic acid and ethylene signaling." Plant Cell Physiol **44**(7): 750-757.

Litwack, G., et al. (1971). "Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions." Nature **234**(5330): 466-467.

- Liu, Y. J., et al. (2013). "Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants." Plant Physiol **161**(2): 773-786.
- Mamathambika, B. S. and J. C. Bardwell (2008). "Disulfide-linked protein folding pathways." Annual review of cell and developmental biology **24**: 211-235.
- Marrs, K. A. (1996). "The Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **47**: 127-158.
- Marrs, K. A., et al. (1995). "A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2." Nature **375**(6530): 397-400.
- Marsh, M., et al. (2008). "Structure of bacterial glutathione-S-transferase maleyl pyruvate isomerase and implications for mechanism of isomerisation." J Mol Biol **384**(1): 165-177.
- Martin, J. L. (1995). "Thioredoxin--a fold for all reasons." Structure **3**(3): 245-250.
- Mashiyama, S. T., et al. (2014). "Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere." PLoS Biol **12**(4): e1001843.
- Mathieu, Y., et al. (2012). "Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties." J Biol Chem **287**(46): 39001-39011.
- Mathieu, Y., et al. (2013). "Diversification of fungal specific class a glutathione transferases in saprotrophic fungi." PLoS One **8**(11): e80298.
- McTigue, M. A., et al. (1995). "Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel." J Mol Biol **246**(1): 21-27.
- Meister, A. (1988). "Glutathione metabolism and its selective modification." J Biol Chem **263**(33): 17205-17208.
- Meister, A. (1988). "On the discovery of glutathione." Trends Biochem Sci **13**(5): 185-188.
- Meister, A., et al. (1981). "Gamma-glutamyl transpeptidase." Methods Enzymol **77**: 237-253.

- Mesecke, N., et al. (2008). "Two novel monothiol glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins." Biochemistry **47**(5): 1452-1463.
- Meux, E., et al. (2013). "New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases." Biochimie **95**(2): 336-346.
- Mieyal, J. J., et al. (1991). "Thioltransferase in human red blood cells: purification and properties." Biochemistry **30**(25): 6088-6097.
- Molina, D. M., et al. (2007). "Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase." Nature **448**(7153): 613-616.
- Møller, I. M. (2001). "Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species." Annu Rev Plant Biol **52**(1): 561-591.
- Moller, I. M., et al. (2007). "Oxidative modifications to cellular components in plants." Annu Rev Plant Biol **58**: 459-481.
- Momose, M., et al. (2013). "Reverted glutathione S-transferase-like genes that influence flower color intensity of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) originated from excision of a transposable element." Breed Sci **63**(4): 435-440.
- Moons, A. (2003). "Osgstu3 and osgtu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots." FEBS Lett **553**(3): 427-432.
- Moons, A. (2005). "Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs)." Vitam Horm **72**: 155-202.
- Morel, F. and C. Aninat (2011). "The glutathione transferase kappa family." Drug Metab Rev **43**(2): 281-291.
- Morel, M., et al. (2013). "Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi." Microbial biotechnology **6**(3): 248-263.
- Mössner, E., et al. (1998). "Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases." Protein Science **7**(5): 1233-1244.

- Mou, Z., et al. (2003). "Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes." Cell **113**(7): 935-944.
- Mozer, T. J., et al. (1983). "Purification and characterization of corn glutathione S-transferase." Biochemistry **22**(5): 1068-1072.
- Mueller, L. A., et al. (2000). "AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein." Plant Physiol **123**(4): 1561-1570.
- Mueller, S., et al. (2008). "General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis." Plant Cell **20**(3): 768-785.
- Neill, S., et al. (2008). "Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress." J Exp Bot **59**(2): 165-176.
- Neuefeind, T., et al. (1997). "Plant glutathione S-transferases and herbicide detoxification." Biol Chem **378**(3-4): 199-205.
- Niegowski, D., et al. (2014). "Crystal structures of leukotriene C4 synthase in complex with product analogs: implications for the enzyme mechanism." J Biol Chem **289**(8): 5199-5207.
- Noctor, G., et al. (1998). "Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants." J Exp Bot **49**(321): 623-647.
- Noguera-Mazon, V., et al. (2006). "Glutathionylation induces the dissociation of 1-Cys D-peroxiredoxin non-covalent homodimer." J Biol Chem **281**(42): 31736-31742.
- Nulton-Persson, A. C., et al. (2003). "Reversible inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in response to alterations in the mitochondrial glutathione status." Biochemistry **42**(14): 4235-4242.
- O'Brien, J. A., et al. (2012). "Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism." Planta **236**(3): 765-779.
- Oakley, A. J., et al. (1999). "The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site)." J Mol Biol **291**(4): 913-926.
- Ohta, T. (2000). "Evolution of gene families." Gene **259**(1): 45-52.

Paillassa, E. (2006). "Quelles pertes de croissance pour 7 cultivars de peuplier face aux attaque de la rouille E4 du mélèze." Forêt entreprise(168): 60-63.

Parke, D. V. (1975). "Induction of the drug-metabolizing enzymes." Basic Life Sci **6**: 207-271.

Pegeot, H., et al. (2014). "The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1." Front Plant Sci **5**: 712.

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

Petit, E., et al. (2009). "Glutathione transferases kappa 1 and kappa 2 localize in peroxisomes and mitochondria, respectively, and are involved in lipid metabolism and respiration in *Caenorhabditis elegans*." FEBS J **276**(18): 5030-5040.

Peyrot des Gachons, C., et al. (2002). "Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc." J Agric Food Chem **50**(14): 4076-4079.

Polekhina, G., et al. (2001). "Crystal structure of maleylacetoacetate isomerase/glutathione transferase zeta reveals the molecular basis for its remarkable catalytic promiscuity." Biochemistry **40**(6): 1567-1576.

Poole, L. B., et al. (2004). "Protein sulfenic acids in redox signaling." Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **44**: 325-347.

Prabhu, K. S., et al. (2004). "Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes." Arch Biochem Biophys **424**(1): 72-80.

Rasool, S. and R. Mohamed (2015). "Plant cytochrome P450s: nomenclature and involvement in natural product biosynthesis." Protoplasma.

Raza, H. (2011). "Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease." FEBS J **278**(22): 4243-4251.

Reinemer, H. C., et al. (1996). "A comparison of two oral ketamine-diazepam regimens for sedating anxious pediatric dental patients." Pediatr Dent **18**(4): 294-300.

- Reinemer, P., et al. (1996). "Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture." *J Mol Biol* **255**(2): 289-309.
- Ren, G., et al. (2009). "Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue." *Journal of Biological Chemistry* **284**(15): 10150-10159.
- Ren, G., et al. (2009). "Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue." *J Biol Chem* **284**(15): 10150-10159.
- Reumann, S., et al. (2009). "In-depth proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes." *Plant Physiol* **150**(1): 125-143.
- Rinaldi, C., et al. (2007). "Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*." *Plant Physiol* **144**(1): 347-366.
- Rinalducci, S., et al. (2008). "Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants." *J Exp Bot* **59**(14): 3781-3801.
- Rost, J. and S. Rapoport (1964). "Reduction-Potential of Glutathione." *Nature* **201**: 185.
- Rouhier, N., et al. (2001). "Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor." *Plant Physiol* **127**(3): 1299-1309.
- Rouhier, N., et al. (2008). "The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation." *Annu Rev Plant Biol* **59**: 143-166.
- Rouhier, N., et al. (2006). "Plant methionine sulfoxide reductase A and B multigenic families." *Photosynth Res* **89**(2-3): 247-262.
- Roxas, V. P., et al. (1997). "Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress." *Nat Biotechnol* **15**(10): 988-991.
- Sappl, P. G., et al. (2009). "The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress." *Plant J* **58**(1): 53-68.

Sappl, P. G., et al. (2004). "Proteomic analysis of glutathione S -transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes." Plant Mol Biol **54**(2): 205-219.

Sjogren, T., et al. (2013). "Crystal structure of microsomal prostaglandin E2 synthase provides insight into diversity in the MAPEG superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(10): 3806-3811.

Smith, A. P., et al. (2004). "Proteomic analysis of *Arabidopsis* glutathione S-transferases from benoxacor- and copper-treated seedlings." J Biol Chem **279**(25): 26098-26104.

Smith, A. P., et al. (2003). "*Arabidopsis* AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids." Plant J **36**(4): 433-442.

Soranzo, N., et al. (2004). "Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family." Mol Genet Genomics **271**(5): 511-521.

Su, T., et al. (2011). "Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell **23**(1): 364-380.

Sun, Y., et al. (2012). "*Arabidopsis* TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts." Mol Plant **5**(2): 387-400.

Tanaka, S., et al. (2007). "Analysis of gene expression in poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra*, DN34) exposed to the toxic explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX)." Int J Phytoremediation **9**(1): 15-30.

Thatcher, N. J. and S. Murray (2001). "Analysis of the glutathione conjugate of paracetamol in human liver microsomal fraction by liquid chromatography mass spectrometry." Biomed Chromatogr **15**(6): 374-378.

Thom, R., et al. (2001). "The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism." J Mol Biol **308**(5): 949-962.

Toppo, S., et al. (2009). "Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme." Biochim Biophys Acta **1790**(11): 1486-1500.

Vanlerberghe, G. C. and L. McIntosh (1997). "ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **48**: 703-734.

Vernoux, T., et al. (2000). "The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development." Plant Cell **12**(1): 97-110.

Wagner, U., et al. (2002). "Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family." Plant Mol Biol **49**(5): 515-532.

Wang, B., et al. (2011). "Crystal structures and kinetic studies of human Kappa class glutathione transferase provide insights into the catalytic mechanism." Biochem J **439**(2): 215-225.

Wang, C., et al. (2013). "Structural insights into the redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase." Antioxid Redox Signal **19**(1): 36-45.

Wang, L., et al. (2014). "Characterization of poplar GrxS14 in different structural forms." Protein Cell **5**(5): 329-333.

Weerapana, E., et al. (2010). "Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes." Nature **468**(7325): 790-795.

Wiegand, R. C., et al. (1986). "Messenger RNA encoding a glutathione-S-transferase responsible for herbicide tolerance in maize is induced in response to safener treatment." Plant Mol Biol **7**(4): 235-243.

Willett, W. S. and S. D. Copley (1996). "Identification and localization of a stable sulfenic acid in peroxide-treated tetrachlorohydroquinone dehalogenase using electrospray mass spectrometry." Chem Biol **3**(10): 851-857.

Winayanuwattikun, P. and A. J. Ketterman (2005). "An electron-sharing network involved in the catalytic mechanism is functionally conserved in different glutathione transferase classes." J Biol Chem **280**(36): 31776-31782.

Wu, G., et al. (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." J Nutr **134**(3): 489-492.

Xun, L., et al. (1992). "Purification and characterization of a tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase from a Flavobacterium sp." J Bacteriol **174**(24): 8003-8007.

Zaffagnini, M., et al. (2008). "Biochemical characterization of glutaredoxins from Chlamydomonas reinhardtii reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin." Journal of Biological Chemistry **283**(14): 8868-8876.

Résumé : Les glutathion transférases (GSTs) constituent une famille multigénique d'enzymes présentes dans les trois domaines du vivant. Cette présence ubiquitaire souligne l'origine sans doute très ancienne de ces enzymes ainsi que des fonctions fondamentales conservées au cours de l'évolution. Ces enzymes sont impliquées notamment dans la détoxification cellulaire de molécules toxiques et dans le métabolisme secondaire. Les analyses phylogénétiques regroupent les GSTs des organismes photosynthétiques au sein de quatorze classes qui peuvent être séparées en deux grands groupes selon le résidu catalytique : les GSTs à sérine catalytique qui possèdent des activités de conjugaison du glutathion (GSH) et/ou peroxydase tandis que les GSTs à cystéine catalytique présentent des activités thioltransférase, déshydroascorbate réductase et de déglutathionylation. Les GSTs à sérine catalytique de la classe Phi (GSTF) sont présentes chez les organismes photosynthétiques et certains basidiomycètes. Chez les plantes, cette classe comprend un nombre de gènes plus important que les autres classes de GSTs. Ceux-ci sont parmi les plus régulés en réponse à divers stress et ils ont été fortement étudiés chez les plantes céréalières en raison de l'activité de détoxification des herbicides des protéines correspondantes. Pourtant, à quelques exceptions près, les rôles physiologiques des GSTFs restent inconnus et la redondance d'isoformes dans cette classe reste incomprise. Par des approches moléculaires, biochimiques et structurales, l'analyse structure-fonction des huit GSTFs de l'arbre modèle *Populus trichocarpa* a été réalisée au cours de cette thèse. L'analyse phylogénétique des GSTFs chez les organismes photosynthétiques a montré que cette classe est apparue au moment de l'apparition terrestre des végétaux et que différents groupes pouvaient être identifiés avec des motifs catalytiques distincts. L'analyse transcriptionnelle a montré que les gènes relatifs aux GSTFs de peuplier sont principalement exprimés dans les fleurs femelles, les pétioles et les fruits. Certains aspects du mécanisme réactionnel ont été caractérisés en déterminant notamment les paramètres cinétiques et d'interaction des huit GSTFs et de plusieurs variants mutés pour des résidus clés vis-à-vis de substrats modèles. Les structures de cinq des huit GSTFs ont été résolues et ces protéines dimériques adoptent un repliement GST canonique et des spécificités structurales au niveau du site actif ont pu être observées. De plus, au regard de la capacité des orthologues des GSTFs à lier des hormones et des flavonoïdes ainsi que de l'expression récurrente des GSTFs de peuplier dans les fruits et les fleurs femelles, deux organes riches en ces molécules, il peut être supposé qu'elles ont aussi des propriétés de type ligandine. Des résultats préliminaires ont également été obtenus pour la recherche de substrats physiologiques à partir de métabolites extraits de différents organes de peuplier. A terme, l'identification de ces substrats permettra de déterminer le mode d'action (catalytique vs ligandine) de chaque enzyme et d'identifier clairement les fonctions *in planta* de ces enzymes.

Mots clés : glutathion transférase ; *Populus trichocarpa* ; Phi ; structures cristallographiques ; mécanismes enzymatiques ; recherche de substrats

Abstract: Glutathione transferases (GSTs) belong to a multigenic family whose presence in most eukaryotes, prokaryotes and archaea reflects their widespread nature and very likely important functions. These enzymes represent a major group of enzymes involved in xenobiotic detoxification and secondary metabolism. From the most recent genomic and phylogenetic analyses, the GST family is subdivided into 14 classes that can be separated into two main groups based on the catalytic residue which is either a serine (Ser-GST) or a cysteine (Cys-GST). Ser-GSTs usually catalyze glutathione (GSH) conjugation and/or peroxide reduction. On the other hand, Cys-GSTs cannot perform GSH-conjugation reactions but instead catalyze thiol-transferase, dehydroascorbate reductase and deglutathionylation reactions. Ser-GSTs from the Phi class (GSTF) are present in photosynthetic organisms and some basidiomycetes. This class is composed of a large number of genes compared to other GST classes which are amongst the most stress-inducible. The corresponding proteins have been extensively studied in crops with regard to their detoxification activities toward herbicides. However, with a few exceptions, very little is known about their roles *in planta* and it is not well understood why this class has expanded. By combining molecular, cellular, biochemical and structural approaches, the eight isoforms from the model tree *Populus trichocarpa* have been characterized during this PhD project. Phylogenetic analysis of GSTFs in the green lineage shows that the apparition of this class is concomitant with the appearance of terrestrial plants and that different groups can be distinguished based on the active site signature. RT-PCR analysis of the eight isoforms of GSTFs showed that transcripts mostly accumulate in female flowers, petioles and fruits. Some aspects of the reaction mechanism have been characterized by determining kinetic parameters of the eight poplar GSTFs and of several mutated variants for key residues towards model substrates. The structures of five GSTFs have been solved and these dimeric proteins display a typical GST fold but specificities have been observed at the catalytic site level. Moreover, considering the demonstrated capacity of GSTF orthologs to bind hormones, anthocyanins or flavonoids, and the consistent high expression of poplar GSTFs in female flowers and fruits, two organs rich in these molecules, we speculate that they may also possess ligandin properties. Preliminary results have been obtained regarding the nature of the substrates in various poplar organs by analyzing protein thermostability in the presence of putative ligands. In order to assess whether a functional redundancy between poplar Phi GSTs exists and to identify their mode of action (catalytic vs ligandin functions), we started to isolate and identify physiological substrates.

Key words: Glutathione transferase; *Populus trichocarpa*; Phi; crystal structures; enzymatic mechanisms; research of substrates.