

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

LA PHYTOHORMONE ACIDE ABSCISSIQUE MODULE LA CARBONYLATION  
DES PROTÉINES CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

MÉMOIRE PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA  
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR  
AMAL JABALLI

Août 2022

Université du Québec à Trois-Rivières  
Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

*À mes chers parents qui ont toujours cru en moi,*

*Lazher et Khira*

*Et mes chers frères Marwen, Bayrem et Haythem*

## REMERCIEMENT

Merci au Bon Dieu le Tout-Puissant de m'avoir guidé pour réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer mes plus chaleureux remerciements à mon directeur de recherche, le professeur Tagnon Missihoun pour son soutien, sa grande disponibilité et sa patience et sa confiance en moi pour réussir ce projet. Je le prie de bien vouloir trouver ici le témoignage de ma vive gratitude pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail dans son laboratoire.

Je remercie également mon codirecteur, le professeur Hugo Germain.

J'adresse mes vifs remerciements à mes collègues de laboratoire pour leur contribution à créer une atmosphère harmonieuse de travail.

Je remercie les évaluateurs Dr Tagnon Missihoun, Dr Marc Beauregard et Dr Charles Goulet d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire de maîtrise.

Je dédie cet humble travail avec sincérité et fierté, à ma famille qui m'a soutenue, m'ont encouragée durant toute ma période d'études.

## RÉSUMÉ

La carbonylation des protéines est une modification post-traductionnelle associée aux espèces réactives de l'oxygène. Elle résulte de l'oxydation directe des chaînes latérales des acides aminés de lysine, arginine, proline et thréonine par le radical hydroxyle ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) ou de l'addition d'espèces réactives carbonylées (RCS), notamment d'aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés et d'oxylipines, à la chaîne latérale de cystéine, histidine et lysine. Il a été montré que la phytohormone acide abscissique (ABA) induit la production d'aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés qui modulent l'effet de l'ABA sur la fermeture des stomates. Cela indique que les aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés pourraient servir de médiateur à la signalisation de l'acide abscissique. Dans cette étude, nous avons examiné les événements de carbonylation des protéines induites par l'ABA en établissant le profil du protéome carbonylé extrait des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* après avoir traité par l'ABA. Les protéines carbonylées ont été ensuite enrichies par chromatographie d'affinité suivie d'une chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem. Cent quatre-vingt protéines ont été identifiées carbonylées. Parmi celles-ci, 26 protéines sont devenues carbonylées lors du traitement à l'ABA, tandis que 163 protéines étaient carbonylées dans les échantillons témoins et n'ont plus été détectées dans les échantillons traités à l'ABA, ce qui indique un contrôle dynamique de la carbonylation des protéines par l'ABA chez *A. thaliana*. Quelques protéines régulatrices liées au stress et des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés de la famille de l'aspartate étaient identifiées dans la liste des protéines dont l'état de carbonylation changeait entre les échantillons non traités et traités par l'ABA. Ces résultats indiquent que l'acide abscissique déclenche un changement dans le schéma de carbonylation des protéines chez *A. thaliana*. Ce changement est indépendant de l'augmentation communément observée des niveaux de protéines carbonylées dans les plantes soumises à des conditions de stress oxydatif.

**Mots clés :** acide abscissique, carbonylation des protéines, Stress modéré, Protéomique, d'espèces carbonylées réactives, Signalisation du stress

## TABLE DE MATIÈRE

<b>REMERCIEMENT .....</b>	<b>I</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>II</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES SYMBOLS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1 ROS.....</b>	<b>1</b>
1.1 Génération et élimination des ROS dans les plantes .....	1
<b>2 Les hormones de stress.....</b>	<b>3</b>
2.1 L'auxine IAA .....	3
2.2 Les cytokinines.....	3
2.3 L'éthylène .....	4
2.4 Les gibbérellines.....	4
2.5 L'acide jasmonique.....	4
2.6 Les brassinostéroïdes .....	5
2.7 L'acide salicylique .....	5
2.8 Acide Abscissique .....	5
2.8.1 Définition .....	5
2.8.2 Structure chimique de l'acide abscissique .....	6
2.8.3 Biosynthèse et métabolisme de l'acide abscissique .....	6
2.8.4 Interaction des ROS avec L'acide abscissique.....	7
2.8.5 Signalisation de L'acide abscissique .....	8
2.8.6 Expression et fonctions des enzymes RBOHs dans la signalisation de l'ABA .....	9
<b>3 Espèces réactives carbonylées dérivées des acides gras (RCS).....</b>	<b>10</b>

3.1	Génération et réactivité .....	10
3.2	Activités biologiques des espèces carbonylées réactives dans les plantes .....	11
3.3	Les espèces réactives carbonylées dérivées fonctionnent comme un médiateur de signal en aval de la production de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans la voie de signalisation de l'acide abscissique .....	11
3.4	Détoxification des espèces réactives carbonylées par les aldéhydes déshydrogénases dépendantes .....	11
<b>4</b>	<b>Modifications des protéines induites par ROS .....</b>	<b>12</b>
4.1	Nitrosylation .....	13
4.2	Cystéinylation (oxydation de la cystéine) .....	13
4.3	S-glutathionylation .....	14
4.4	Persulfuration .....	14
4.5	Oxydation de la méthionine .....	15
4.6	Carbonylation des protéines .....	15
4.6.1	<b>Définition .....</b>	<b>15</b>
4.6.2	<b>Génération de carbonyles de protéines .....</b>	<b>15</b>
4.6.3	<b>Cibles de la carbonylation des protéines et contrôle métabolique .....</b>	<b>17</b>
4.6.4	<b>Rôle de la carbonylation des protéines dans l'activation de la signalisation cellulaire chez les procaryotes .....</b>	<b>18</b>
4.6.4.1	<i>Chez les procaryotes .....</i>	18
4.6.4.2	<i>Chez les animaux .....</i>	19
4.6.4.3	<i>Chez les plantes .....</i>	21
4.6.4.3.1	<i>La carbonylation des protéines comme réponse majeure au stress chez les plantes .....</i>	21
4.6.4.3.2	<i>Carbonylation des protéines et développement des plantes .....</i>	23
4.6.4.3.3	<i>L'implication de la carbonylation des protéines dans les voies de signalisation des phytohormones .....</i>	23
4.6.4.3.4	<i>Le devenir des protéines carbonylées .....</i>	25
<b>CHAPITRE II</b>		
	<b>PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS .....</b>	<b>28</b>
<b>CHAPITRE III .....</b>		
	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>30</b>
1	<b>Plantes et conditions de croissance .....</b>	<b>30</b>

<b>2</b>	<b>Traitements.....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Extraction de l'ARN.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Analyses RT-PCR.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>Analyses PCR.....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>Détermination de la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>Extraction des protéines.....</b>	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>Marquage des protéines carbonylées.....</b>	<b>34</b>
8.1	Marquage des protéines carbonylées avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH).....	34
8.1.1	<i>Préparation des protéines marquées par le DNPH pour l'électrophorèse sur gel de SDS.....</i>	34
8.1.2	<i>Essais immunologiques par immunobuvardage.....</i>	34
8.2	Marquage des protéines carbonylées avec des sondes fluorescentes .....	35
8.2.1	<i>Préparation des échantillons .....</i>	35
8.2.2	<i>Électrophorèse sur gel et détection par fluorescence .....</i>	35
<b>9</b>	<b>Identification des protéines carbonylées par LC/MS-MS.....</b>	<b>36</b>
9.1	Enrichissement des protéines carbonylées avec une suspension d'agarose à l'avidine36	
9.2	Analyse par spectrométrie de masse.....	37
9.3	Recherche dans les bases de données .....	38
<b>CHAPITRE IV</b>		
<b>RÉSULTATS .....</b>		<b>40</b>
<b>1</b>	<b>Effet de l'acide abscissique (ABA) exogène sur l'expression des gènes sensibles au stress.....</b>	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>Dosage de ROS .....</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>Sélection du protocole de marquage au carbonyle des protéines .....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>Analyse du protéome carbonylée induite par l'ABA par SDS-PAGE.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>Détection des protéines carbonylées induites par l'ABA par LC-MS/MS .....</b>	<b>47</b>
5.1	Approche .....	47
5.2	Détection des protéines carbonylées induites par l'ABA .....	48
<b>CHAPITRE V</b>		

<b>DISCUSSION.....</b>	<b>56</b>
1 <b>Le choix de la méthode de marquage des protéines carbonylées.....</b>	<b>56</b>
2 <b>Signification des protéines carbonylées dans les plantes témoins.....</b>	<b>57</b>
3 <b>L'ABA modifie le schéma de carbonylation des protéines dans les feuilles .....</b>	<b>61</b>
<b>CHAPITRE VI</b>	
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>65</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>67</b>
<b>PUBLICATIONS.....</b>	<b>93</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>94</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structure de l'acide abscissique .....	6
Figure 1.2 Représentation schématique de la biosynthèse de l'ABA chez les plantes .....	7
Figure 1.3 Un modèle schématique de la voie de signalisation de l'ABA pendant la fermeture stomatique.....	9
Figure 1.4 Modifications des protéines induites par les ROS .....	13
Figure 1.5 Mécanisme de la carbonylation primaire .....	16
Figure 1.6 Mécanisme de la carbonylation secondaire.....	17
Figure 1.7 Exemple d'activation de la signalisation cellulaire par la carbonylation des protéines chez les procaryotes.....	19
Figure 1.8 Activation de la signalisation cellulaire par la carbonylation des protéines dans la cellule animale .....	21
Figure 1.9 Diagramme illustrant la relation entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les phytohormones et les modifications post-traductionnelles des protéines.....	27
Figure 4.1 Quantification de la teneur en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> des tissus d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	41
Figure 4.2 Analyse du protéome carbonylé induit par l'ABA par deux méthodes différentes.....	43
Figure 4.3 Analyse du protéome carbonylée induite par l'ABA par 1D SDS-PAGE.....	44
Figure 4.4 Analyse du protéome carbonylée induite par des traitements des stress légers par SDS-PAGE .....	46
Figure 4.5 Aperçu du flux de travail expérimental pour le marquage sélectif des protéines carbonylées dans l'extrait protéique .....	47
Figure 4.6 Diagramme de Venn des protéines carbonylées dans les échantillons témoins et les échantillons traités à l'ABA .....	49
Figure 4.7 Analyse d'enrichissement de l'ontologie génétique .....	54
Figure 4.8 Localisation subcellulaire prédite des protéines carbonylées dans les feuilles d' <i>Arabidopsis thaliana</i> dans les échantillons témoins.....	55
Figure 5.1 Un aperçu des enzymes carbonylées de la voie de biosynthèse des acides aminés dérivés de l'aspartate .....	60

Figure 5.2 Rôle potentiel de la glycosyltransférase UGT79B7 dans la régulation du niveau de l'ABA par le biais de la carbonylation chez <i>Arabidopsis thaliana</i> en réponse au stress.....	64
Figure S.1 Analyse du protéome carbonylée induite par l'ABA par SDS-PAGE pour les réplicats 2 et 3.....	67
Figure S.2 Effet des traitements de stress léger sur les semis d' <i>Arabidopsis thaliana</i> de type sauvage (WT) pour les réplicats 2 et 3 .....	68
Figure S.3 Effet des traitements de stress léger sur les semis d' <i>Arabidopsis thaliana</i> du mutant <i>RbohD</i> pour les réplicats 2 et 3.....	69
Figure S.4 Effet des traitements de stress léger sur les semis d' <i>Arabidopsis thaliana</i> du mutant <i>RbohF</i> pour les réplicats 2 et 3.....	70
Figure S.5 Effet des traitements de stress léger sur les semis d' <i>Arabidopsis thaliana</i> du mutant <i>RbohD/F</i> pour les réplicats 2 et 3.....	71

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 Liste des séquences des amorces utilisées dans l'analyse transcriptomique	33
Tableau 4.1 Expression des gènes du stress suite au traitement avec 100 µM d'acide abscissique dans des plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> âgées de 14 jours.....	40
Tableau 4.2 Exemples des protéines carbonylées sélectionnées dans les échantillons de plantes témoins .....	50
Tableau 4.3 Exemples des protéines carbonylées sélectionnées dans les échantillons de plantes témoins (Suite).....	51
Tableau 4.4 Exemples des protéines carbonylées sélectionnées dans les échantillons de plantes traitées à l'ABA.....	52
Tableau S.1 Liste complète des protéines carbonylées identifiées dans trois réplicats biologiques des échantillons de plantes témoins. ....	72
Tableau S.2 Liste complète des protéines carbonylées identifiées dans trois réplicats biologiques des échantillons de plantes témoins (Suite 1).....	73
Tableau S.3 Liste complète des protéines carbonylées identifiées dans trois réplicats biologiques des échantillons de plantes témoins (Suite 2).....	74
Tableau S.4 Liste complète des protéines carbonylées identifiées dans trois réplicats biologiques des échantillons de plantes témoins (Suite 3).....	75
Tableau S.5 Liste complète des protéines carbonylées identifiées dans trois réplicats biologiques des échantillons de plantes traitées avec l'ABA. ....	76
Tableau S.6 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins.....	77
Tableau S.7 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 1).....	78
Tableau S.8 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 2).....	79
Tableau S.9 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 3).....	80

Tableau S.10 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 4) .....	81
Tableau S.11 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 5) .....	82
Tableau S.12 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 6) .....	83
Tableau S.13 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 7) .....	84
Tableau S.14 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 8) .....	85
Tableau S.15 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 9) .....	86
Tableau S.16 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 10) .....	87
Tableau S.17 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 11) .....	88
Tableau S.18 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes traitées avec l'ABA .....	89
Tableau S.19 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes traitées avec l'ABA (Suite 1) .....	90
Tableau S.20 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes traitées avec l'ABA (Suite 2) .....	91
Tableau S.21 Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes traitées avec l'ABA (Suite 3) .....	92

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ABA-GE	Abscise de $\beta$ -D-Glucopyranosyl
-SH	Groupe thiol
(ET)-1	Endothéline
1D-PAGE	Électrophorèse unidimensionnelle sur gel de SDS-Polyacrylamide
$^1\text{O}_2$	Oxygène singlet
4-HNE	4-hydroxynonénal
AAO	Aldéhyde oxydase abscissique
ABA	Acide abscissique
ADN-T	ADN de transfert
ADNc	ADN complémentaire
AGC	Contrôle automatique du gain
AGE	Produits de glycation avancée
ALDH	Aldéhyde déshydrogénases dépendantes du NAD(P)+
APX	Ascorbate peroxydase
ARE	Élément de réponse antioxydant
ARP	Sonde réactive à l'aldéhyde
ASK	Kinase régulatrice du signal d'apoptose
BR	Brassinostéroïdes
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
CAT	Catalase
CK	Cytokinines
Cy5.5	Colorant cyanine 5.5
Cy7.5	Colorant cyanine 7.5
DNP	2,4-dinitrophénylhydrazone DNP
DNPH	2,4-dinitrophénylhydrazine
ET	Éthylène
GA	Gibbérellines
Gp91phox de NOX2	Sous-unité de la membrane plasmique de la NADPH oxydase
GSH	Glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
H <sub>2</sub> S	Sulfure d'hydrogène
HCD	Plus haute énergie
HCl	Acide chlorhydrique
HO <sup>-</sup>	Radical hydroxyle
IAA	Auxine
IgG	Immunoglobuline G

JA	Acide jasmonique
KAT1	Canal potassique
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LC/MS-MS	Chromatographie d'affinité suivi d'une chromatographie liquide
LOOH	Hydroperoxyde lipidique
MCO	Oxydation catalysée par les métaux
MDA	Malondialdéhyde
Met	Methionine
MetO	Sulfoxyde de méthionine
MGF	Format générique Mascot
Mn-SOD	Manganèse Superoxyde Dismutase
Mn <sup>2+</sup>	Manganèse
MS	Murashige and Skoog
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH oxydases	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NCED	9-cis époxycaroténoïde dioxygénase
NO	Oxyde nitrique
NRF2	Nuclear Factor erythroid 2-related Factor 2
O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Superoxyde
OH <sup>•</sup>	Radical hydroxyle
OST1	Open Stomata 1
p/v	Percent Masse/Volume
PBS	Solution saline tampon phosphate
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
pH	Potentiel de l'hydrogène
PP2C	Protéine phosphatase 2C
PTM	Modifications post-traductionnelles
PYR/PYL/RCAR	Pyrabactin résistance/PYR1-like/Composant Régulateur du
<i>RBOHD</i>	Homologues de l'oxydase de l'explosion respiratoire D
<i>RBOHF</i>	Homologues de l'oxydase de l'explosion respiratoire F
ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène
RT-PCR	Transcription inverse de l'amplification en chaîne par polymérase
SA	Acide salicylique
SDR	Déshydrogénase/réductase des alcools à chaîne courte
SDS	Sulfate de dodécyle de sodium
SDS-PAGE	Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SLAC1	Slow Anion Channel-Associated 1
SnRK2.6	Protéines kinases 2s liées au sucre non fermentant 1
SOD	Superoxyde dismutase

SUBA	Base de données subcellulaires pour les protéines d' <i>Arabidopsis</i>
H <sub>2</sub> S	Sulfure d'hydrogène
TCA	Acide trichloracétique
UV	Ultraviolet
v/v	Percent Volume/Volume
WT	Type sauvage
ZEP	Enzyme zéaxanthine époxydase

## LISTE DES SYMBOLS

$^{\circ}\text{C}$	Degrés Celsius
g	Gramme
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
m	mètre
ml	Millilitre
M	Molaire
n	Nano
$\mu$	Micro
h	Heures
$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	par mètre carré par seconde
%	Pourcent
g	Gravité
M	Molaire
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

La productivité des cultures est principalement influencée par les conditions climatiques, les facteurs agronomiques, les parasites et la disponibilité des éléments nutritifs du sol [1]. Les effets de ces conditions défavorables sur la productivité des plantes sont devenus de plus en plus préoccupants en raison du rythme et de l'intensité croissants des changements climatiques mondiaux [2]. L'amélioration de la tolérance des cultures aux conditions de stress abiotique nécessite une compréhension approfondie des réponses des plantes aux changements environnementaux. Cette réponse dépend des événements de transduction du signal impliquant des molécules de signalisation essentielles telles que les espèces réactives de l'oxygène (ROS), diverses hormones végétales et d'autres molécules de signalisation. L'intégration de ces événements de signalisation orchestre la réponse des plantes au stress abiotique et entraîne des changements dans les réseaux transcriptomiques, métaboliques et protéomiques qui conduisent à l'acclimatation et à la survie des plantes [2].

## 1 ROS

### 1.1 Génération et élimination des ROS dans les plantes

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont été considérées comme des sous-produits du métabolisme normal de l'oxygène. Ils comprennent des radicaux libres comme les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) et l'oxygène singlet ( $^1\text{O}_2$ ), ainsi que des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  [3-5]. Les chloroplastes, les mitochondries, le peroxysome et l'apoplaste sont les principaux sites producteurs des espèces réactives de l'oxygène [6-8]. L'accumulation de ROS mitochondriaux pendant le stress abiotique est généralement médiée par une fuite d'électrons des complexes I et III pour produire l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), qui peut être transformé en  $\text{H}_2\text{O}_2$  par la superoxyde dismutase SOD [9, 10]. La production de ROS dans l'apoplaste pendant le stress abiotique est médiée par les protéines RBOHs (Respiratory

Burst Oxidase Homolog). Lors d'un stress abiotique, les niveaux de ROS peuvent être réduits par un ensemble d'enzymes et de voies de piégeage des ROS comme les superoxydes dismutases (SOD), les ascorbates peroxydases (APX), les peroxydases liées à la paroi cellulaire et de Glutathion (GSH). La production de ROS photorespiratoire est principalement atténuée par la catalase (CAT) qui accélère sa dismutation [11, 12].

## 1.2 Homéostasie des ROS

Le métabolisme des cellules végétales produit en permanence des ROS, mais ce faible niveau d'homéostasie des ROS peut être considérablement perturbé lorsque les plantes sont exposées à des conditions de stress environnemental [13, 14]. Comme des quantités élevées de ROS peuvent causer des dommages oxydatifs en induisant la peroxydation des lipides, les protéines et l'ADN [15], un réseau de signalisation redox composé de gènes qui contrôlent les métabolites et les enzymes antioxydants est nécessaire pour maintenir les ROS à des niveaux faibles. Par le biais d'interactions avec des composés redox-actifs tels que l'ascorbat, le GSH et le NAD(P)H, les ROS ont un impact profond sur l'homéostasie redox cellulaire [16]. Les plantes peuvent ainsi utiliser les ROS comme molécules de signalisation pour réguler les fonctions physiologiques normales [15] et tolérantes au stress, et elles ont mis en place des mécanismes pour résister à leurs conséquences néfastes [16, 17].  $H_2O_2$  est un acteur clé dans une variété de processus physiologiques, y compris la sénescence [18], la photorespiration et la photosynthèse [18], le mouvement stomatique [19], le cycle cellulaire [12], la croissance et le développement [12] et l'adaptation des plantes aux conditions environnementales défavorables [20].  $H_2O_2$  possède les caractéristiques d'une molécule de signalisation efficace en raison de sa durée de vie relativement longue, de sa faible réactivité et de sa synthèse étroitement régulée [21]. L'état d'oxydoréduction cellulaire influence non seulement des processus spécifiques comme la fermeture des stomates, la résistance aux maladies et l'architecture des plantes [16], mais intègre également des données provenant du métabolisme, de l'environnement et des réponses aux stress biotiques et abiotiques pour moduler la croissance des plantes, les réponses adaptatives et la mort cellulaire programmée [17]. La capacité antioxydante des molécules antioxydantes cellulaires, ainsi que la somme des molécules redox-actives

réductrices et oxydantes sont utilisées pour calculer l'état redox cellulaire. L'activation des réponses d'acclimatation par les ROS pourrait être médiée par des interactions des ROS avec différentes hormones.

## 2 Les hormones de stress

Comme les facteurs de stress abiotiques affectent pratiquement tous les éléments de la croissance, du développement et de la reproduction des plantes, ils provoquent des variations dans les niveaux et la distribution des hormones végétales. Les hormones végétales ou phytohormones sont de petites molécules organiques naturelles qui régulent de nombreux aspects de la croissance et de la différenciation des plantes et sont impliquées dans l'atténuation de différents stress biotiques et abiotiques [22].

Ces hormones comprennent l'acide abscissique (ABA), l'auxine (IAA), les brassinostéroïdes (BR), les cytokinines (CK), l'éthylène (ET), les gibbérellines (GA), l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA) [23-27]. Les hormones végétales jouent un rôle important dans la détermination de la réponse d'acclimatation des plantes au stress abiotique et biotique. En outre, pour coordonner le développement des plantes et les réponses au stress, des réseaux d'interaction vastes existent entre les voies de signalisation des ROS et des hormones [28-31].

### 2.1 L'auxine IAA

Les auxines sont des phytohormones impliquées dans le processus de croissance et de développement, y compris la division cellulaire, l'elongation et la différenciation via des changements de modèles d'expression génétique [32, 33]. Il existe de nombreuses études qui soutiennent l'implication des auxines dans la médiation et l'amélioration de la tolérance des plantes aux facteurs de stress abiotiques [33].

### 2.2 Les cytokinines

Les cytokinines (CK) sont impliquées dans le maintien de la croissance et le développement des plantes [34, 35], ainsi que dans la prévention de la sénescence, ce qui permet d'éviter la sénescence précoce des feuilles. Une réduction de la cytokinine entraîne une fermeture des stomates induite par l'acide abscissique, ce qui réduit l'absorption et

l'assimilation du carbone, tandis que la régulation à la hausse de la cytokinine oxydase peut également réduire le métabolisme du carbone dans des conditions de stress. Les cytokinines jouent un rôle important dans la réponse aux stress abiotiques. Ils interviennent aussi dans l'amélioration de la résistance des plantes contre les agents pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les insectes nuisibles [36].

### **2.3 L'éthylène**

L'éthylène (ET) est une phytohormone gazeuse qui régule la croissance et le développement des plantes, comme la sénescence des fleurs, la maturation des fruits, l'abscission des pétales et des feuilles, ainsi que les réponses au stress [37, 38]. Les niveaux d'éthylène endogènes dans les plantes sont affectés par une variété de facteurs de stress abiotiques. La tolérance au stress est améliorée lorsque les niveaux d'ET sont plus élevés [39]. En combinaison avec d'autres hormones comme les jasmonates et l'acide salicylique, l'éthylène, régule la défense des plantes contre les facteurs de stress biotiques[37, 40].

### **2.4 Les gibbérellines**

La gibbérelline est un autre régulateur crucial dans la croissance des plantes qui joue un rôle dans la dormance des graines, la croissance des organes floraux et des branches latérales [41]. L'acide gibbérellique stimule la croissance et le développement des plantes dans diverses conditions de stress abiotique [42]. Il favorise l'absorption efficace et la répartition des ions dans les plantes, ce qui entraîne une croissance accrue et le maintien du métabolisme des plantes dans des conditions normales et stressantes [43]. Les gibbérellines ont également le potentiel d'interagir avec d'autres phytohormones, provoquant des réponses essentielles et médiant des processus de tolérance au stress. En outre, il a été montré que l'acide gibbérellique a augmenté l'activité des enzymes antioxydantes en réduisant les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui a permis d'améliorer la croissance sous stress [44].

### **2.5 L'acide jasmonique**

Les jasmonates (JAs) sont des phytohormones multifonctionnelles qui proviennent du métabolisme des acides gras membranaires et sont présentes dans une variété d'espèces

végétales[37]. les JAs interviennent dans les processus de la fructification, la floraison, la sénescence et le métabolisme secondaire [37, 45]. Ils sont impliqués dans les réponses au stress biotique et abiotique telles qu' à la salinité, la sécheresse, l'irradiation et les basses températures [37, 46].

## 2.6 Les brassinostéroïdes

Les brassinostéroïdes (BRs) sont des phytohormones polyhydroxy-stéroïdiennes qui contrôlent la croissance et le développement des plantes, comme la croissance des racines et des tiges, ainsi que l'initiation et le développement des fleurs [37]. Ils interviennent dans les réactions aux stress abiotiques tels que le froid, les températures élevées, la salinité du sol, la sécheresse, la lumière, les inondations et les polluants organiques [37].

## 2.7 L'acide salicylique

L'acide salicylique et ses dérivés sont des acides phénoliques. Il est impliqué dans une variété de fonctions physiologiques, y compris la stimulation de la floraison, l'absorption d'ions, le transfert de nutrition, le contrôle du mouvement des stomates, l'échange de gaz et la synthèse des protéines. L'acide salicylique améliore la réponse de la plante au stress biotique et abiotique. Il renforce la résistance de la plante en favorisant ou en modifiant la signalisation endogène dans la dissection interne des feuilles pour tolérer un large éventail du stress. Il agit également comme un stimulant ou un transmetteur cellulaire, permettant à la plante de supporter des conditions de stress environnemental telles que la sécheresse, le froid, la chaleur, le stress lié aux métaux lourds et le stress salin [47]. De plus, il stimule la réponse de la plante à la tolérance et à la résistance aux différentes maladies affectant les plantes.

## 2.8 Acide Abscissique

### 2.8.1 Définition

L'acide abscissique (ABA) est un acide faible à 15 atomes de carbone qui a été découvert comme inhibiteur de croissance dans les fruits du coton abscissant (" abscisine II ") au début des années 1960 [48-50]. De nombreux aspects de la croissance et du développement des plantes, y compris la maturation de l'embryon, la dormance des

graines, la germination, la division et l'elongation des cellules, l'induction florale et les réponses aux stress environnementaux tels que la sécheresse, la salinité, le froid, les attaques de pathogènes et le rayonnement UV, peuvent être régulés par l'ABA. L'acide abscissique, malgré son nom, ne semble pas contrôler directement l'abscission ; sa présence dans les organes en abscission reflète plutôt son implication dans l'augmentation de la sénescence et/ou des réponses au stress, qui sont des processus qui se produisent avant l'abscission.

### 2.8.2 Structure chimique de l'acide abscissique

L'acide abscissique est une molécule sesquiterpène de 15 atomes de carbone de formule chimique  $C_{15}H_{20}O_4$ . Sa structure chimique a finalement été établie en utilisant des techniques spectroscopiques [51] et une synthèse chimique [52]. Son nom systématique est (S) -5- (Acide 1-hydroxy-2,6,6-triméthyl-4-oxo-1-cyclohexyl) -3-méthyl-cis, trans-penta-2,4-diénoïque. Cette phytohormone est composée de trois résidus d'isoprène. Elle possède également un cycle cyclohexane avec un groupe cétone et un groupe hydroxyle, ainsi qu'une chaîne latérale avec un groupe carboxylique terminal. (Figure 1.1)

L'orientation du groupe carboxylique autour du deuxième atome de carbone dans la molécule détermine sa structure : les isomères "cis" et "trans" de l'ABA. Le cis-ABA est la forme active. Cependant, le trans-ABA peut être converti en cis-ABA [48]. L'ABA existe par ailleurs sous deux formes énantiomères S et R [53].

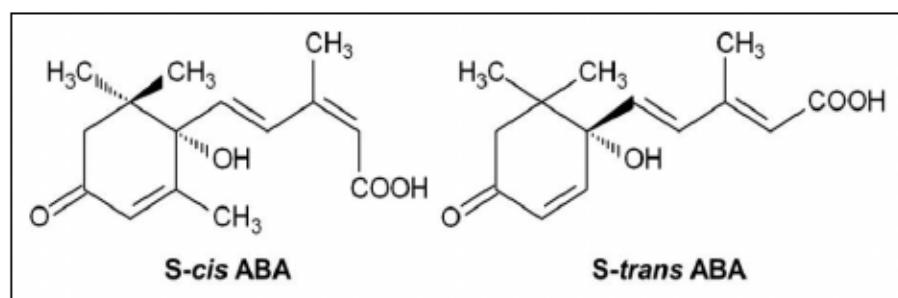


Figure 1.1 Structure de l'acide abscissique [53]

### 2.8.3 Biosynthèse et métabolisme de l'acide abscissique

L'ABA est synthétisé à partir de caroténoïdes dans une série de réactions dans les plastes et le cytoplasme. L'enzyme zéaxanthine époxydase (ZEP) convertit les caroténoïdes en zéaxanthine et la zéaxanthine en violaxanthine dans les plastes. La dégradation oxydative de la violaxanthine par l'enzyme 9-cis époxycaroténoïde dioxygénase (NCED) donne de la néoxanthine qui est transformée en xanthoxine [54, 55].

Ensuite, le produit xanthoxine est exporté vers le cytosol où la xanthoxine est transformé en ABA par une série d'étapes oxydatives via l'intermédiaire aldéhyde abscissique par les enzymes déshydrogénase/réductase des alcools à chaîne courte (SDR) et l'aldéhyde oxydase abscissique (AAO) [48].

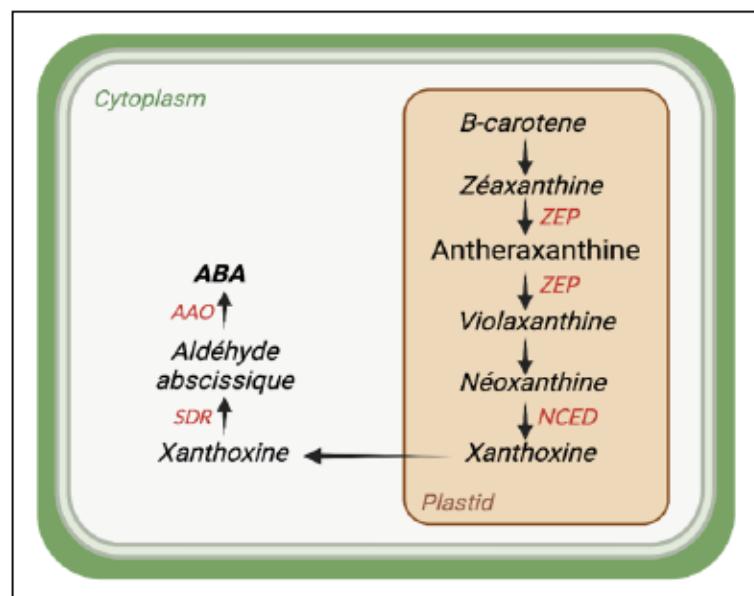


Figure 1.2 Représentation schématique de la biosynthèse de l'ABA chez les plantes. La figure est créée avec BioRender.com et adaptée de [56].

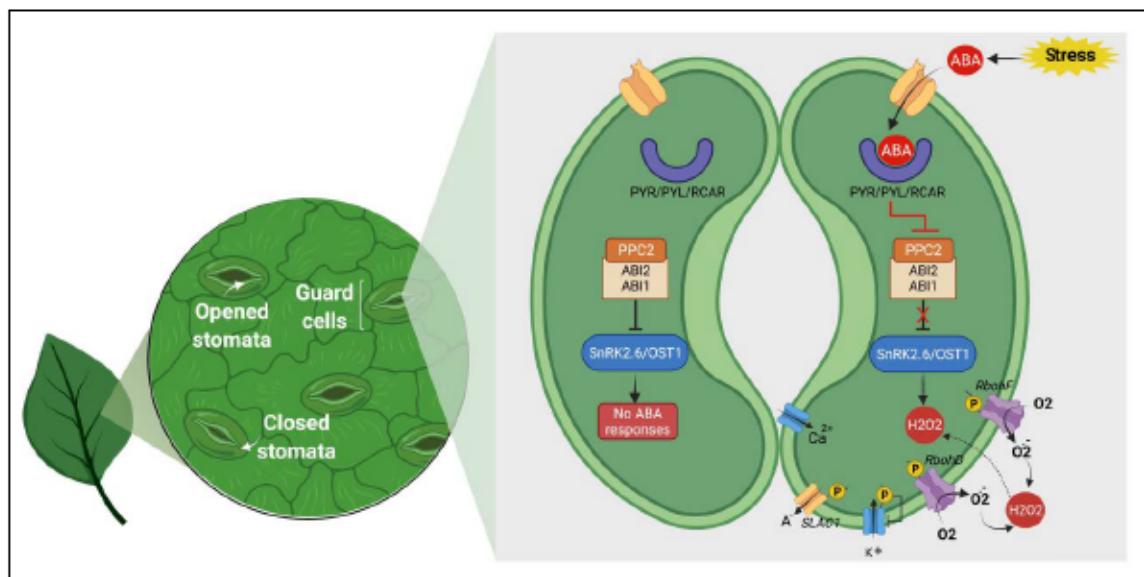
#### 2.8.4 Interaction des ROS avec L'acide abscissique

L'acide abscissique joue un rôle important dans le développement des plantes, la modulation de la fonction des stomates et la réponse des plantes aux facteurs de stress abiotiques. Lorsque les plantes sont exposées à un stress, leur concentration en acide abscissique s'élève en raison d'une augmentation de la biosynthèse, de la libération d'ABA actif à partir des formes conjuguées ou d'une diminution de sa dégradation [57]. Le manque d'eau et le stress lié à une forte salinité stimulent l'accumulation d'ABA, ce qui

entraîne des modifications de l'expression génétique et la fermeture des stomates [58, 59]. La fermeture des stomates réduit la transpiration et la perte d'eau, mais elle réduit également les échanges gazeux et l'activité photosynthétique.

### 2.8.5 Signalisation de l'acide abscissique

En raison de son rôle majeur dans l'adaptation des plantes aux facteurs de stress abiotiques, l'acide abscissique est l'une des phytohormones les plus étudiées. Les principaux composants de la voie de signalisation de l'ABA ont été identifiés [50, 60-64] : La concentration croissante d'ABA dans les cellules de garde en réponse à des circonstances de stress (par exemple, une attaque de pathogènes, la sécheresse) déclenche une cascade de signalisation qui conduit à la fermeture des stomates et à la réduction de la transpiration. La perception de l'ABA par les protéines récéptrices Pyrabactin résistance/PYR1-like/Composant Régulateur du Récepteur de l'ABA (PYR/PYL/RCAR) [65, 66] provoque des changements de conformation dans leur structure protéique, ce qui entraîne la liaison et l'inhibition des membres de la famille de la protéine phosphatase 2C (PP2C) qui agissent comme des répresseurs constitutifs du régulateur l'Open Stomata 1 (OST1), également connu sous le nom de SnRK2.6 (un membre de la famille des protéines kinases 2s liées au sucre non fermentant 1 [50]. Après la dérépression, SnRK2.6/OST1 atteint une activation complète par autophosphorylation, puis phosphoryle davantage ses protéines cibles, telles que les RBOHF et RBOHD. La phosphorylation des protéines de RBOHF et RBOHD entraîne la génération des ROS localisées dans l'apoplaste [67, 68]. Les canaux d'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  sont activés par cette poussée oxydative [69]. SnRK2.6/OST1 active également le canal anionique Slow Anion Channel-Associated 1 (SLAC1) [70, 71] qui est important dans les cellules de garde. Le canal potassique KAT1, qui réduit sa fonction lorsqu'il est phosphorylé, est un autre canal ionique ciblé par SnRK2/OST1 [72].



**Figure 1.3** Un modèle schématique de la voie de signalisation de l'ABA pendant la fermeture stomatique. La figure est créée avec BioRender.com et adaptée de [73-75].

Ces processus de signalisation fonctionnent ensemble pour contrôler les quantités d'ions osmotiquement actives dans les cellules de garde par l'activité coordonnée des canaux membranaires (Figure 1. 2).

#### 2.8.6 Expression et fonctions des enzymes RBOHs dans la signalisation de l'ABA

Les enzymes RBOHs ont été identifiées pour la première fois dans les cellules phagocytaires humaines pour leur rôle dans la génération de ROS au cours de la défense contre les pathogènes [76]. Les enzymes RBOHs ont été trouvées dans les plantes sur la base de leur similarité de séquence avec la sous-unité gp91phox de NOX2 [77]. Les protéines RBOHs ou les NADPH oxydases catalysent la réduction de l'oxygène en anion superoxyde ( $O_2^-$ ), qui utilisent le NADPH comme source d'électrons. L'anion superoxyde peut générer du  $H_2O_2$  par dismutation enzymatique ou non enzymatique. La famille de gènes *Rboh* est surtout étudiée chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Elle comprend 10 membres (*RbohA* à *RbohJ*). Les réponses au stress abiotique et le développement sont également régulés par les ROS produits par les Rboh-NADPH oxydases des plantes. Pendant la fermeture des stomates, les ROS servent d'intermédiaires dans la signalisation de l'acide abscissique [78]. Les cellules de garde expriment les gènes *RbohD* et *RbohF*,

qui sont transcriptionnellement activés en réponse à l'ABA. Dans les cellules de garde non endommagées,  $H_2O_2$  active les canaux  $Ca^{2+}$ , qui médient l'augmentation de la concentration cytosolique de  $Ca^{2+}$  [69]. L'activation des canaux  $Ca^{2+}$  par l'ABA et la fermeture des stomates sont entravés chez le double mutant d'*Arabidopsis thaliana RbohD/RbohF*, bien que l'administration exogène de  $H_2O_2$  rétablisse l'activation des canaux  $Ca^{2+}$  et la fermeture partielle des stomates chez le double mutant *RbohD/RbohF* [67].

### 3 Espèces réactives carbonylées dérivées des acides gras (RCS)

#### 3.1 Génération et réactivité

Les espèces réactives carbonylées (RCS) sont des composés électrophiles générés par la peroxydation lipidique causée par les ROS, en particulier dans les membranes des mitochondries et les chloroplastes en raison de leur abondance en acides gras polyinsaturés (acide linoléique, acide linolénique et acide arachidonique) [79-81]. La peroxydation des lipides est un processus dans lequel des espèces radicalaires telles que les radicaux hydroxyles enlèvent des électrons aux lipides et produisent ensuite une grande variété d'électrophiles réactifs comportant un groupe carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturé. Les principaux produits primaires de la peroxydation des lipides sont les hydroperoxydes lipidiques (LOOH). Ces composés peuvent être formés par des voies enzymatiques et non enzymatiques. La classe de molécules résultant de la peroxydation des lipides la plus étudiée est celle des aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés comme l'acroléine, le malondialdéhyde (MDA), l'hydroxyl-hexanal (HHE) et l'hydroxyl-nonénal (HNE) [82, 83]. Le MDA semble être le produit de peroxydation lipidique le plus mutagène, tandis que le 4-HNE semble être le plus létal [84, 85]. Les composés carbonylés  $\alpha,\beta$ -insaturés peuvent réagir avec les nucléophiles tels que les protéines et forment des adduits de type Michael. Par conséquent, ils peuvent avoir des effets biologiques indésirables graves, notamment une toxicité générale et une mutagénicité. En revanche, de faibles niveaux de ces espèces sont présents de manière ubiquitaire dans tous les organismes supérieurs, même dans les conditions dépourvues du stress [86].

### **3.2 Activités biologiques des espèces carbonylées réactives dans les plantes**

Malgré leur diversité structurelle et leur origine biosynthétique, plusieurs composés carbonylés  $\alpha,\beta$ -insaturés peuvent être impliqués dans plusieurs variétés d'activités biologiques comme l'induction de gènes de défense, l'induction du métabolisme secondaire, l'inhibition de l'elongation des racines et l'altération de la croissance des semis [87]. Plusieurs RCS affectent négativement l'activité photosynthétique tenant l'exemple de l'acroléine qui endommagent fortement le photosystème II.

### **3.3 Les espèces réactives carbonylées dérivées fonctionnent comme un médiateur de signal en aval de la production de $\text{H}_2\text{O}_2$ dans la voie de signalisation de l'acide abscissique**

Il a été constaté que l'acide abscissique induit la production de RCS dans le tissu épidermique de la feuille [88]. Parmi les espèces réactives carbonylées, les aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés ont stimulé l'activation des canaux cationiques perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  dans la membrane plasmique et l'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  libre cytosolique dans les cellules de garde des mutants *RbohD* et *RbohF* d'*Arabidopsis* défectueux dans la génération de ROS induite par l'ABA [88, 89]. L'incubation des feuilles avec de la carnosine et de la pyridoxamine qui sont considérés comme des piègeurs aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés, a inhibé la fermeture des stomates induite par l'ABA et le  $\text{H}_2\text{O}_2$  sans affecter la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  induite par l'ABA, ce qui suggère que les aldéhydes,  $\alpha,\beta$ -insaturés peuvent servir de médiateurs à la signalisation de l'ABA [88-90]. Les RCS incluant les aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés réagissent principalement avec les protéines par carbonylation [80, 91].

### **3.4 Détoxification des espèces réactives carbonylées par les aldéhydes déshydrogénases dépendantes**

Les cellules utilisent une variété de processus de détoxification enzymatique et non enzymatique pour faire face aux effets négatifs des RCS. Les aldéhydes déshydrogénases dépendantes du  $\text{NAD(P)H}$  (ALDHs) sont impliquées dans le piégeage enzymatique des

aldéhydes produits par la peroxydation lipidique liée au stress qui constituent une vaste superfamille de protéines dont les membres sont largement répartis entre les génomes humains et végétaux [92, 93]. Les ALDH sont des enzymes NAD(P)+-dépendantes qui oxydent une large gamme de composés aldéhydiques aliphatiques et aromatiques endogènes et exogènes en leurs acides carboxyliques [94].

Des résultats précédents ont montré que les ALDH inductibles par le stress sont régulés au niveau transcriptionnel par l'ABA [95, 96]. Outre leurs fonctions dans le métabolisme et la réponse aux stress biotiques [97-100] et abiotiques [101-103], les gènes ALDH ont récemment été liés au développement des plantes [104-106].

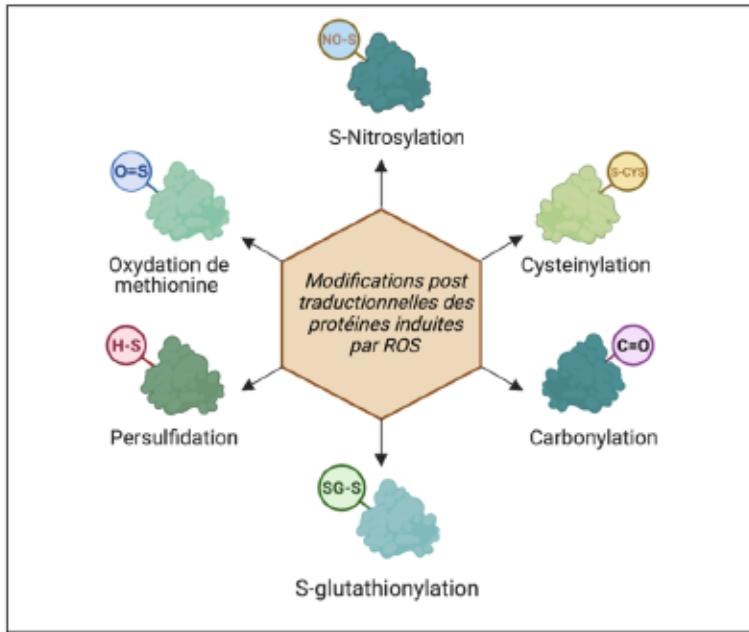
Les ALDH, comme les enzymes déubiquitinases, peuvent être impliquées dans la prévention de l'inactivation de certaines protéines de transduction du signal par la carbonylation en oxydant les composés carbonylés réactifs. Nous pensons que les recherches futures devraient se concentrer sur ces domaines afin d'approfondir notre compréhension des activités des ALDH végétales dans le développement des plantes.

Une revue de littérature détaillée sur ces enzymes a été rédigée et publiée concernant les rôles des ALDH végétales dans le métabolisme, la signalisation et le développement intitulée « Recent Development on Plant Aldehyde Dehydrogenase Enzymes and Their Functions in Plant Development and Stress Signaling ». L'article est mis dans la partie Publications.

#### **4 Modifications des protéines induites par ROS**

Les ROS peuvent réguler les cascades de signalisation des plantes en modulant l'activité des protéines cibles par des modifications oxydatives réversibles et/ou irréversibles sur les résidus sensibles qui peuvent conduire à un changement de l'activité ou de la fonction de la protéine oxydée [107, 108]. Les modifications post-traductionnelles (PTMs) affinent la localisation des protéines, leur interaction et leur fonction pour atténuer les dommages du stress environnemental [108].

Les modifications directes des protéines comprennent la nitrosylation, la cystéinylation, la carbonylation d'acides aminés spécifiques, la glutathionylation, la persulfidation et l'oxydation de méthionine, tandis que les modifications indirectes comprennent la conjugaison des protéines aux produits de dégradation de la peroxydation lipidique [109].



**Figure 1.4** Modifications des protéines induites par les ROS. La figure est créée avec BioRender.com et adaptée de [90].

#### 4.1 Nitrosylation

L'oxyde nitrique (NO) produit des PTMs covalentes chez plusieurs protéines, généralement en combinaison avec d'autres espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Cette PTM est appelée S-Nitrosylation [110]. Elle implique la fixation du groupe NO à un résidu de cystéine. La S-Nitrosylation module la performance des enzymes photorespiratoires, le flux de métabolites de différentes voies dans les peroxysomes, et protège contre les dommages oxydatifs produits par l'accumulation de  $H_2O_2$  [111].

Chez *Arabidopsis*, la nitrosylation de RbohD à la cystéine (Cys<sup>890</sup>) élimine la production de ROS empêchant la mort des cellules de garde lorsque ces cellules subissent une réponse immunologique induite par un pathogène [111, 112].

#### 4.2 Cystéinylation (oxydation de la cystéine)

Les résidus cystéine avec des groupes thiol sont des centres redox qui sont impliqués dans la structure des protéines, la catalyse enzymatique, la transduction du signal et la régulation de l'activation transcriptionnelle [113]. En réponse à des niveaux accrus d'espèces réactives de l'oxygène, une molécule de cystéine terminale s'ajoute sur des groupes thiol libres des résidus de cystéine internes dans une protéine via un lien disulfure [114]. Cette modification est appelée cystéinylation. Certaines bactéries telles que *Bacillus subtilis* utilisent la cystéinylation comme mécanisme de protection des groupes thiols libres suite à un stress oxydatif [115]. Néanmoins, l'hyperoxydation des résidus de cystéine causée par un niveau élevé de peroxyde dû au stress entraîne des dommages aux protéines et une perte irréversible de l'activité protéique [116, 117].

#### 4.3 S-glutathionylation

La S-glutathionylation des protéines est une modification post-traductionnelle spécifique des résidus de cystéine des protéines qui implique la formation d'un disulfure mixte entre les thiols des protéines et le glutathion [118]. Elle est favorisée par un stress oxydatif, mais se produit également dans des conditions physiologiques. Des études ont montré qu'elle est impliquée dans la protection des cystéines des protéines contre l'oxydation irréversible, mais aussi dans la régulation redox des protéines. La S-glutathionylation a été liée au contrôle des voies de signalisation et métaboliques dans les systèmes biologiques. Cette modification régule de nombreuses molécules de signalisation et des facteurs de transcription impliqués dans le développement cellulaire, la différenciation et l'apoptose.

#### 4.4 Persulfuration

La persulfuration (également connue sous le nom de sulfhydratation) est une forme de modification post-traductionnelle des protéines qui implique l'ajout d'une molécule de soufre au groupe thiol (-SH) réactif d'un résidu de cystéine [119]. La persulfuration est présente dans tous les règnes de la vie, y compris les plantes [120], les animaux [121] et les microbes [122]. Il s'agit d'un mécanisme redox qui contrôle les localisations protéiques et/ou subcellulaires afin de réguler de nombreux processus biologiques dans la signalisation du sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ) [123, 124]. La S-sulfhydratation peut soit

stimuler, soit inactiver les activités enzymatiques [121]. Il a été démontré que la persulfuration de la protéine RbohD par l'acide abscissique est nécessaire pour contrôler la signalisation de l'ABA dans les cellules de garde [125].

#### **4.5 Oxydation de la méthionine**

La plupart des espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent oxyder les résidus méthionine (Met) des protéines en sulfoxyde de méthionine (MetO) [126]. Ces oxydations peuvent conduire à des altérations de la conformation des protéines [127, 128] et à une perte d'activité biologique des protéines oxydées [129, 130]. Cependant, l'oxydation réversible des résidus méthionine des protéines peut être impliquée dans la régulation de certaines activités enzymatiques et hormonales peptidiques [131] et joue un rôle antioxydant important dans le piégeage des ROS [132].

### **4.6 Carbonylation des protéines**

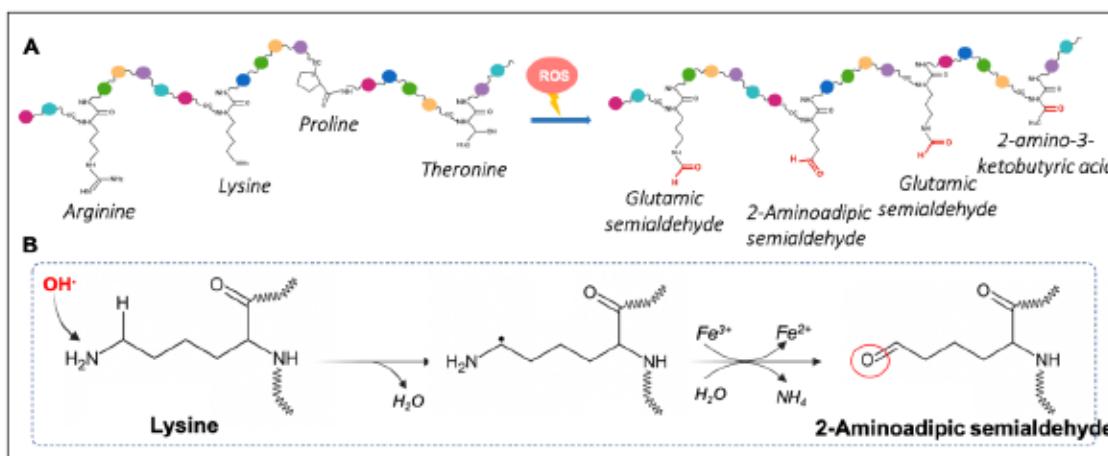
#### **4.6.1 Définition**

La carbonylation des protéines est une modification post-traductionnelle (PTM) dans laquelle un groupe carbonyle réactif, tel qu'un aldéhyde, une cétone ou un lactame, est formé dans les chaînes latérales de certains acides aminés [133]. Elle se produit dans les tissus animaux et végétaux, causée par les conditions de stress et les maladies associées à l'âge [134-137]. La chimie de la carbonylation des protéines est complexe en raison des différentes biomolécules impliquées, y compris les dérivés des lipides et des sucres. Elle représente la modification chimique la plus fréquente et irréversible qui affecte la fonction des protéines [138].

#### **4.6.2 Génération de carbonyles de protéines**

Historiquement, l'oxydation catalysée par les métaux (MCO) a été identifiée pour la première fois comme une source de protéines carbonylées. Le processus est appelé carbonylation primaire des protéines [91, 139]. Le MCO est produit par la réaction de Fenton, qui se produit lorsque des ions de métaux de transition ( $Fe^{2+}$ ) sont réduits en

présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) générant des radicaux hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) hautement réactifs. Ces radicaux hydroxyles oxydent les chaînes latérales des acides aminés ou brisent le squelette de la protéine, ce qui entraîne une variété de changements, tels que des carbonyles réactifs. La proline et l'arginine, par exemple, sont oxydées en semialdéhyde glutamique, tandis que la lysine est convertie en semialdéhyde aminoacide et la thréonine est oxydée en acide 2-amino-3-cétobutyrique (figure 1.5).

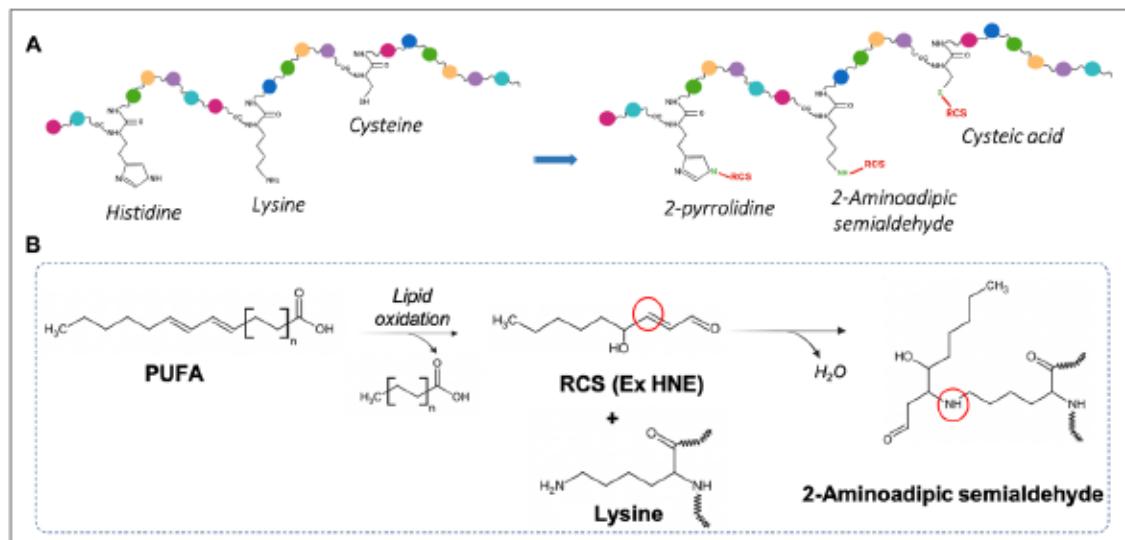


**Figure 1.5** Mécanisme de la carbonylation primaire. A : Les ROS attaquent directement la protéine par oxydation des chaînes latérales des résidus arginine, lysine, proline et thréonine. B : Exemple d'oxydation de lysine par une carbonylation primaire. Dans ce cas, les radicaux hydroxyles dérivés de la réaction de Fenton des ions métalliques divalents et  $H_2O_2$  attaque le groupement  $\epsilon$ -aminé de l'acide aminé en arrachant un atome d'hydrogène du carbone voisin. Le produit formé est instable et facilement hydrolysé pour générer le correspondant carbonyle de la protéine. La figure est créée avec BioRender.com. L'exemple B est adapté de [140].

En outre, l'oxydation directe d'autres résidus d'acides aminés peut également conduire à des carbonyles liés aux protéines. L'oxydation du tryptophane par les ROS produit au moins sept produits d'oxydation. La kynurénine et la N-formyl kynurénine, ainsi que leurs variantes hydroxylées, sont toutes caractérisées par des groupes aldéhyde ou cétone [141, 142].

Une autre source importante de carbonylation des protéines est constituée par les produits réactifs de la peroxydation des lipides (4-hydroxynonénal (4-HNE), 2-propénal

(acroléine) et malondialdéhyde (MDA)), un processus qualifié de carbonylation secondaire des protéines [139, 143]. Elle implique l'addition d'espèces carbonylées réactives (RCS) aux chaînes latérales de la cystéine, de l'histidine et de la lysine par des réactions d'addition de Michael [140, 144].



**Figure 1.6** Mécanisme de la carbonylation secondaire. A : Les ROS attaquent directement la protéine par oxydation des chaînes latérales des résidus histidine, lysine et cystéine. B : Exemple d'une carbonylation secondaire par réaction d'addition de Michael avec les résidus de lysine. La figure est créée avec BioRender.com. L'exemple B est adapté de [140].

La carbonylation des protéines peut également se produire via la glycoxidation. La glycation implique la réaction des sucres réducteurs tels que le glucose ou le fructose avec les chaînes latérales des résidus de lysine et d'arginine formant des produits d'Amadori. Les ROS peuvent ensuite décomposer ces résidus en produits finaux de glycation avancée (AGE) avec des fragments carbonylés [145, 146].

#### 4.6.3 Cibles de la carbonylation des protéines et contrôle métabolique

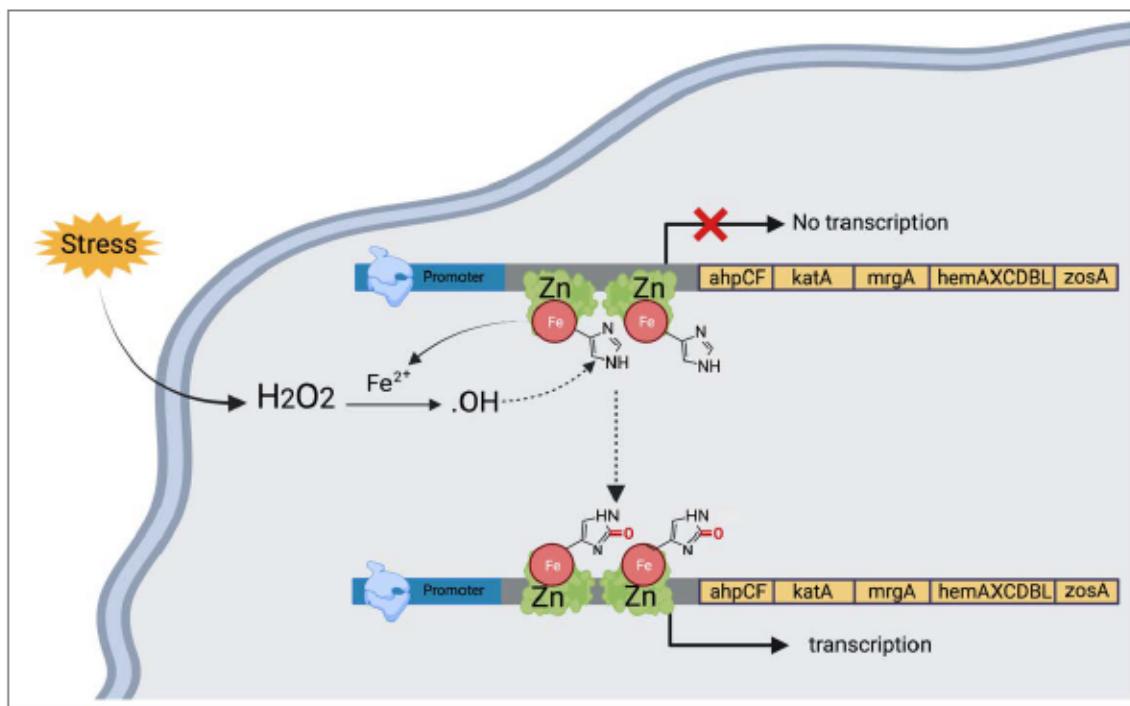
La carbonylation des protéines a été identifiée comme un marqueur universel du stress oxydatif lié à diverses maladies humaines, notamment la maladie d'Alzheimer, les maladies pulmonaires chroniques, l'insuffisance rénale chronique, le diabète, la

septicémie, la sclérose latérale amyotrophique, la cataractogenèse, la mucoviscidose, la polyarthrite rhumatoïde et les lésions d'ischémie-reperfusion [147, 148]. Une forte corrélation entre l'apparition/progression de la maladie et le stress oxydatif a été trouvée dans un plus grand nombre de données pour soutenir l'importance de la carbonylation des protéines dans la pathophysiologie des troubles humains [149, 150]. Levine et Stadtman [151] ont proposé que les niveaux de carbonylation des protéines augmentent avec l'âge, soutenant le rôle de la carbonylation des protéines dans le vieillissement des cellules, des tissus et des organes.

#### **4.6.4 Rôle de la carbonylation des protéines dans l'activation de la signalisation cellulaire chez les procaryotes**

##### **4.6.4.1 Chez les procaryotes**

La voie de signalisation impliquant l'activation d'une protéine par carbonylation vient d'être caractérisée pour la première fois chez les bactéries. Ces dernières ont développé des systèmes complexes pour contrôler de manière coordonnée l'absorption des métaux et les réponses au stress oxydatif [152]. Le facteur de transcription PerR est le principal régulateur de la réponse au stress induite par le peroxyde d'hydrogène chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. PerR est un répresseur des gènes de la peroxiredoxine (ahpCF), de la catalase (katA), de la miniferritine (mrgA), de l'opéron de biosynthèse de l'hème (hemAXCDBL), du répresseur d'absorption du fer (fur) et du système d'absorption du Zn (zosA) [153-155]. La dérépression de ces gènes dans des conditions de stress au peroxyde via la carbonylation de PerR mène à la détection et la résistance au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme réponse adaptative [156]. Lee et Helmann [157] ont révélé que la détection du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produit par une oxydation de PerR catalysée par un métal et conduit à l'expression de gènes de défense oxydative. PerR possède deux sites de liaison aux métaux : un site structural Zn<sup>2+</sup> et un site régulateur d'ions métalliques divalents qui lie de préférence Fe<sup>2+</sup> ou Mn<sup>2+</sup>. L'oxydation de la protéine, catalysée par un ion ferreux lié, entraîne l'incorporation rapide et directe d'un atome d'oxygène dans l'histidine<sup>37</sup> ou l'histidine<sup>91</sup>. Ce mécanisme explique la capacité de PerR à détecter de faibles niveaux de peroxyde d'hydrogène *in vivo* (Figure 1.4).



**Figure 1.7** Mécanisme de la carbonylation primaire. La figure est créée avec BioRender.com et adaptée de [90, 154, 158, 159].

#### 4.6.4.2 Chez les animaux

Les travaux de Wong *et al* [139] ont donné le premier aperçu de cette voie de transduction du signal des ROS dans les cellules de mammifères. Les auteurs ont démontré que le puissant peptide vasoconstricteur endothéline (ET)-1 provoque la carbonylation de plusieurs protéines cibles uniques dans les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires de rat.

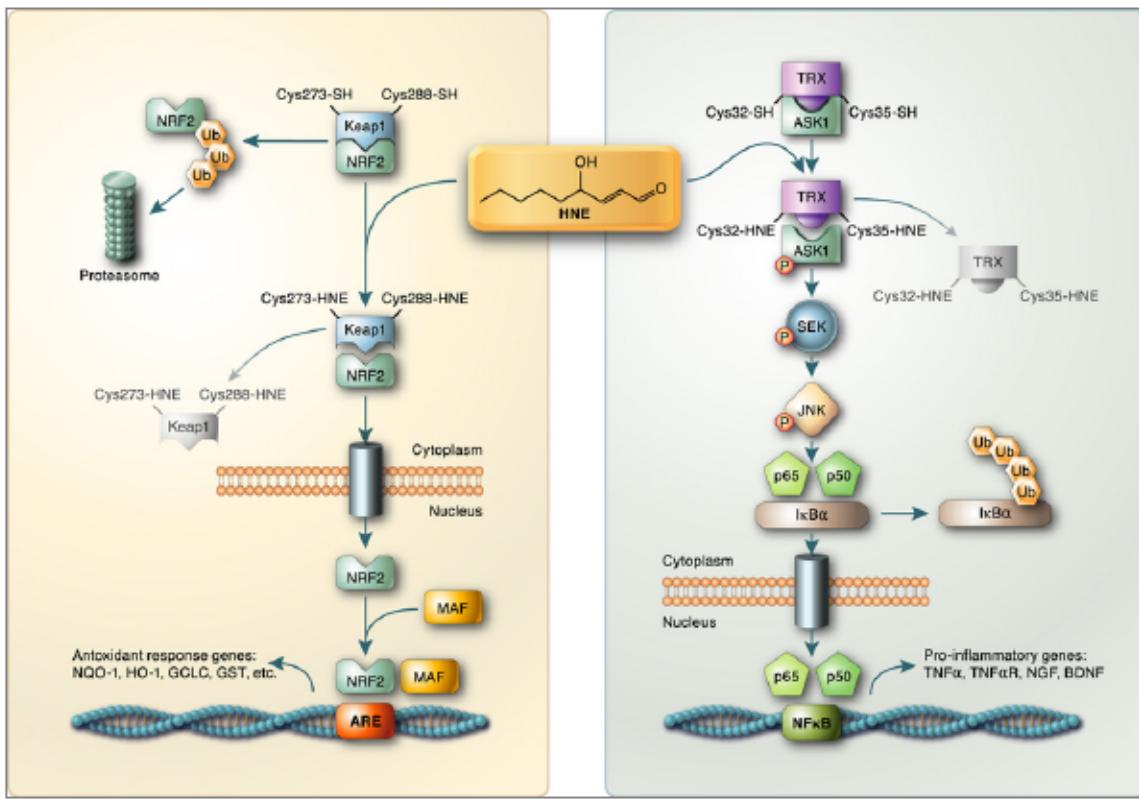
L'endothéline (ET)-1 est produite par les cellules endothéliales vasculaires qui contribue à la vasoconstriction et au remodelage vasculaire dans la circulation pulmonaire, qui se produisent dans l'hypertension pulmonaire [156].

Wong *et al.* ont montré dans leur article qu'une réduction de type Fenton est également responsable de la carbonylation des protéines qu'ils ont observées. Lorsque les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires ont été exposées à l'ET-1, un certain nombre de protéines ont été carbonylées, notamment des facteurs antioxydants et protecteurs comme la peroxiredoxine-6, ainsi que des facteurs proapoptotiques comme l'annexine A1. Les protéines de annexin A1 ont été soumises à une dégradation rapide médiée par le

protéasome. Dans leur article, Wong *et al.* indiquent en outre que cette voie de signalisation redox médiée par l'ET-1 pourrait avoir un rôle causal dans les changements phénotypiques normaux des cellules musculaires lisses des artères et artéries pulmonaires dans le développement de l'hypertension pulmonaire.

Il a été démontré aussi que la carbonylation des protéines est impliquée dans l'activation de la voie du Nuclear Factor erythroid 2-related Factor 2 (NRF2)-Kelch-like ECH-Associated Protein 1 (KEAP1) qui contrôle l'expression des enzymes antioxydantes de la phase II [160]. Dans des conditions normales, KEAP1 se lie à NRF2 en le séquestrant du noyau [161] et en le ciblant pour une dégradation protéasomique. Lors de la carbonylation de KEAP1 par un produit de peroxydation lipidique (par exemple HNE), NRF2 est libéré et transloque vers le noyau après carbonylation des thiols clés de KEAP1. Dans le noyau, il se dimérisé avec une variété de facteurs nucléaires, dont MAF et NRF1. Ce complexe interagit avec l'élément de réponse antioxydant (ARE), déclenchant l'activation des cascades de gènes de réponse antioxydante (Figure 1.5 gauche). Lorsque le stress diminue, la KEAP1 carbonylée subit une dégradation protéasomique [162, 163]. Ces résultats montrent que la carbonylation de la protéine KEAP1 favorise la réponse antioxydante et diminue ainsi le stress oxydatif.

En outre, l'activité de la kinase régulatrice du signal d'apoptose 1 (ASK) peut être régulée par carbonylation [164, 165]. Dans des conditions basales, la thiorédoxine (TRX) régule négativement ASK1 en la séquestrant de l'autophosphorylation et de l'activation [166]. La carbonylation de la thiorédoxine induite par les produits de peroxydation lipidique entraîne la libération de ASK1 du complexe. L'activation de l'ASK1, par la carbonylation de la thiorédoxine, conduit à une cascade d'événements de phosphorylation entraînant l'expression de cibles génétiques pro-inflammatoires (Figure 1.5 droite).



**Figure 1.8** Activation de la signalisation cellulaire par la carbonylation des protéines dans la cellule animale [167].

#### 4.6.4.3 Chez les plantes

##### 4.6.4.3.1 La carbonylation des protéines comme réponse majeure au stress chez les plantes

Les plantes produisent les ROS en réponse à des facteurs de stress biotiques et abiotiques [168, 169]. Par conséquent, une réponse précoce des plantes au stress est souvent liée à une explosion oxydative qui entraîne la carbonylation des protéines [170, 171]. La salinité [172], la déshydratation [173, 174], le CO<sub>2</sub> élevé [175] ou le stress thermique [56] et les facteurs de stress biotiques (par exemple, les attaques de pathogènes) provoquent une carbonylation accrue des protéines chez les plantes.

La quantité de carbonylation des protéines semble être proportionnelle à la durée d'exposition et à la quantité de ROS produite dans des circonstances de stress. Par

conséquent, ce PTM a été un biomarqueur utile du degré de stress oxydatifs chez les plantes.

La sélectivité de la carbonylation des protéines sous stress semble être une caractéristique conservée, même dans des conditions extrêmes. Dans le cas d'une oxydation catalysée par un métal, les activités enzymatiques des protéines sensibles ont été considérablement réduites, ce qui relie la carbonylation aux changements métaboliques induits par le stress [176]. De plus, 20 protéines carbonylées ont été signalées dans la matrice des mitochondries des feuilles de riz *in vivo* et 32 protéines supplémentaires ont été spécifiquement carbonylées après un stress oxydatif [177]. De même, chez les plants de pois soumis à un stress au cadmium, la photosynthèse a été considérablement réduite en même temps que la carbonylation des sous-unités RuBisCO [173, 178, 179].

Plusieurs substances chimiques liées à la tolérance au stress paraissent augmenter ou diminuer la carbonylation des protéines dans les plantes, en plus des enzymes impliquées dans la "machinerie antioxydante cellulaire". La carbonylation des protéines induites par le stress est empêchée par l'administration de l'oxyde nitrique exogène pendant ou avant les conditions de stress abiotique. Le NO, par exemple, a amélioré la tolérance à la dessiccation des graines récalcitrantes d'*Antiaris toxicaria* en activant les enzymes de la voie ascorbate-glutathion, en minimisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et en favorisant la S-nitrosylation plutôt que la carbonylation des protéines impliquées. Par conséquent, l'oxyde nitrique semble inhiber la carbonylation des protéines induite par les ROS dans les graines résistantes pendant le séchage [174]. La réduction de la carbonylation des protéines ne semble pas être directement médiée par le NO, mais semble plutôt être le résultat de l'induction de la machinerie antioxydante par le NO.

En cas du stress, la carbonylation des protéines pourrait être un signe de l'équilibre entre un environnement promouvant favorisant l'oxydation et la capacité de la cellule végétale à y faire face. Elle pourrait d'abord entraîner la désactivation des protéines qui ne sont pas nécessaires à la survie. Cependant, si les enzymes de détoxification sont surchargées, l'accumulation de ROS qui en résulte entraîne l'arrêt des processus enzymatiques restants, ce qui provoque la mort de la cellule.

#### *4.6.4.3.2 Carbonylation des protéines et développement des plantes.*

La carbonylation des protéines et son importance au cours des processus de développement des plantes sont peu connues. Néanmoins, cette modification a été découverte à chaque étape du cycle de vie de la plante [170, 180-182]. Plusieurs études sur la biologie des graines [136, 170, 176, 183] ont mis en évidence le rôle de la carbonylation des protéines dans les changements physiologiques. On a observé qu'elle augmente pendant la perte de germination des graines vieillissantes *d'Arabidopsis* [182], pendant la levée de la dormance des graines [170], la sénescence des mitochondries des nodules de légumineuses [136], la sénescence des mitochondries de pommes [183], pendant la dessiccation des graines récalcitrantes *d'Antiaris toxicaria* [174], et durant la germination des graines *d'Arabidopsis* [181]. Il a été observé que la carbonylation des protéines diminuait dans les embryons de graines de pomme pendant la levée de la dormance [184] et qu'elle fluctuait dans les graines de pomme au cours de la stratification [185]. Dans la plupart de ces études, seul le niveau total de carbonylation a été déterminé, et on ne sait pas quelles protéines ont été affectées. Ces observations doivent donc être suivies d'études plus détaillées avant que le rôle de la carbonylation des protéines dans ces processus puisse être établi.

#### *4.6.4.3.3 L'implication de la carbonylation des protéines dans les voies de signalisation des phytohormones*

La phytohormone acide abscissique (ABA) est connue pour favoriser la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les protéines RbohD et RbohF sur la membrane plasmique des cellules de garde *d'Arabidopsis*. En utilisant des plantes de tabac transgéniques surexprimant la 2-alcénal réductase, Islam *et al.* ont établi que les espèces réactives carbonylées (RCS) fonctionnent en aval de la génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la signalisation de l'ABA pour la fermeture stomatique dans les cellules de garde [18]. Les niveaux des RCS dans les tissus épidermiques traités à l'ABA ont augmenté dans 30 minutes et sont restés élevés pendant 2 heures. Les RCS ont été produits en réponse à la fois à l'ABA et au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [88]. La carnosine et la pyridoxamine qui sont des capteurs de RCS, n'ont pas eu d'effet sur la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induite par l'ABA, mais ont empêché

la fermeture des stomates induite par l'ABA et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [186]. La fermeture stomatique induite par le jasmonate de méthyle (MeJA) dans les cellules de garde d'*A. thaliana* nécessite la formation de ROS par les protéines de Rboh, tout comme la fermeture stomatique induite par l'ABA [67, 69, 187, 188]. Le jasmonate de méthyle (MeJA), comme l'ABA, a provoqué l'accumulation de RCS tels que le HNE et l'acroléine dans les plants de tabac WT, ce qui implique que les espèces sont impliquées dans la fermeture des stomates induite par la MeJA [189]. Il a été montré que la fermeture stomatique induite par le MeJA s'accompagne d'une diminution des niveaux de glutathion (GSH) intracellulaire dans les cellules de garde d'*Arabidopsis* [190], mais que le GSH n'a aucune influence sur la génération de ROS induite par le MeJA [191]. Par conséquent, le GSH est nécessaire après la production des ROS. La génération des ROS initiée par le MeJA provoque systématiquement une déplétion du GSH dans les cellules de garde [189], ce qui montre que les cibles des ROS dans les cellules de garde sont probablement en aval de la génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les protéines RbohD et RbohF.

Dans la cellule de garde, le calcium agit comme un second messager dans la signalisation de l'ABA et la fermeture stomatique induite par l'ABA [192-194]. La fermeture stomatique induite par le jasmonate de méthyle (MeJA) dans les cellules de garde était également liée à une augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> libre cytosolique ([Ca<sup>2+</sup>] cyt) [188]. L'afflux de Ca<sup>2+</sup> en provenance de l'apoplaste et du stockage intracellulaire entraîne une augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> libre cytosolique lorsque les canaux cationiques perméables au Ca<sup>2+</sup> de la membrane plasmique sont activés [67, 69, 195]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoque une augmentation du niveau de [Ca<sup>2+</sup>]cyt dans les cellules de garde en activant les canaux cationiques perméables au Ca<sup>2+</sup> (I<sub>Ca</sub>) [69]. L'administration exogène de l'acroléine était plus efficace que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène pour augmenter le ([Ca<sup>2+</sup>] cyt et promouvoir la fermeture des stomates [186].

Les RCS sont des médiateurs de signaux en aval de la synthèse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les RBOHs et en amont de l'induction du signal Ca<sup>2+</sup> dans les cellules de garde d'*Arabidopsis* pour la fermeture stomatique médiee par l'ABA et le MeJA, selon les découvertes de Mano au cours de la dernière décennie [186]. Des cellules de garde ont été traitées avec 100 µM

d'acroléine et de HNE pendant 4 heures, et leurs stomates se sont progressivement fermés. Étonnamment, lorsque la solution de bain a été remplacée par une solution ne contenant ni acroléine ni HNE, la fermeture des stomates a été inversée [186]. Étant donné que la carbonylation des protéines est irréversible, ces observations laissent également entrevoir un taux de renouvellement plus élevé des protéines ciblées par le RCS.

#### *4.6.4.3.4 Le devenir des protéines carbonylées*

Il est essentiel de comprendre comment les protéines carbonylées se comportent dans les cellules végétales. La carbonylation des protéines étant considérée comme irréversible, une dégradation efficace des protéines oxydées est nécessaire pour éviter les conséquences négatives de leur accumulation. En raison d'une réticulation covalente et/ou d'une hydrophobie de surface accrue, ces protéines ont tendance à former des agrégats de poids moléculaire élevé si elles ne sont pas détruites [196]. En outre, l'accumulation de protéines inactives pourrait concurrencer leurs homologues natives actives en termes de fonction. Plusieurs processus de protéolyse différents équilibrent le degré de carbonylation des protéines dans les cellules végétales pour éviter cela. Le protéasome, tout comme chez les mammifères, joue un rôle crucial dans ce processus. Cependant, la dégradation cytosolique des protéines carbonylées semble être médiée principalement par la voie du protéasome 20S, plutôt que par le protéasome 26S, d'une manière indépendante de l'ATP et de l'ubiquitine [197, 198]. De plus, l'autophagie peut éliminer les protéines carbonylées. Plusieurs facteurs de stress environnementaux, en particulier les conditions oxydatives, activent ce processus non spécifique de dégradation des protéines, ce qui entraîne une élimination accrue des protéines carbonylées [171].

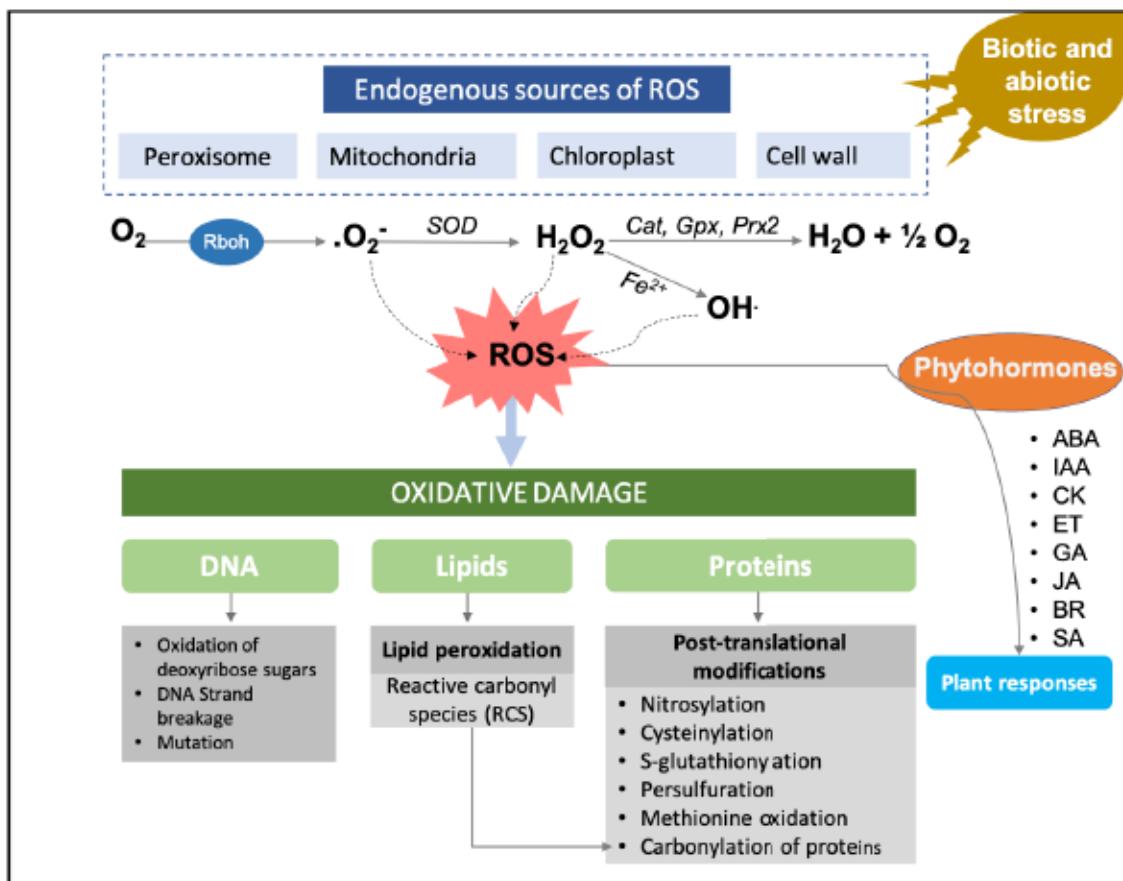
Enfin, les protéases mitochondriales et plastidiales, notamment celles appartenant à la famille AAA+ ATP-dépendante, telles que les protéases Lon et FtsH, empêcheraient les protéines carbonylées de s'accumuler dans ces organites [199, 200].

Les protéines carbonylées ne sont pas exclusivement obtenues par ces processus protéolytiques distincts. Toutefois, certains d'entre eux, comme la voie du protéasome 20S, semblent détruire les protéines carbonylées plutôt que les protéines non modifiées

[197]. Par conséquent, cette modification post-traductionnelle pourrait être utilisée comme une alternative pour aborder la dégradation protéolytique des protéines. La carbonylation des protéines pourrait aider les cellules végétales à dégrader de cette manière les protéines mal traduites, endommagées, anormales ou même devenues inutiles. Par conséquent, en plus de son effet sur la fonction des protéines, ce changement pourrait avoir un impact significatif sur la qualité des protéines et la dynamique du protéome [201]. Dans les plantes stressées, la dégradation des protéines oxydées pourrait fournir une voie de respiration alternative [202]. Par conséquent, la carbonylation des protéines peut contribuer à la survie des plantes dans des situations de stress. Selon des recherches récentes, la carbonylation des protéines pourrait également jouer un rôle dans la transmission des signaux. Dans ce contexte, les peptides issus de la dégradation oxydée des protéines pourraient participer à la signalisation des ROS en fonctionnant comme des messagers secondaires des ROS [203]. Cependant, chez les plantes, l'occurrence de tels événements n'a pas encore été établie.

Une revue de littérature détaillée sur la carbonylation des protéines a été rédigée et publiée intitulée « Protein Carbonylation: Emerging Roles in Plant Redox Biology and Future Prospects ». L'article est mis dans la partie Publications.

En guise de synthèse de cette partie d'introduction, un schéma illustrant la relation entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les phytohormones et les modifications post-traductionnelles des protéines a été créé (Figure 1.9).



**Figure 1.9** Diagramme illustrant la relation entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les phytohormones et les modifications post-traductionnelles des protéines. Dans les conditions de croissance normales, les ROS peuvent être produits dans les mitochondries, les chloroplastes, les peroxysomes, la membrane plasmique, l'apoplaste et la paroi cellulaire par de nombreuses enzymes, y compris les protéines RBOHs. Les différentes formes de ROS comprennent le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle. Les ROS en excès peuvent être piégés par l'action des enzymes antioxydantes. Les composants de la défense antioxydante sont la catalase, la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx). Au cours de leur cycle de vie, les plantes subissent de nombreux types de stress biotiques et abiotiques. La perception du stress est suivie d'une signalisation induite par le stress qui peut inclure la production des ROS et l'activation de phytohormones. L'interaction entre les hormones végétales et la signalisation des ROS orchestre la réponse d'acclimatation des plantes à différentes conditions de stress. Une production excessive de ROS peut entraîner un stress oxydatif qui modifie l'ADN, les lipides et les protéines. Les modifications des protéines comprennent la cystéinylation, la nitrosylation, l'oxydation de la méthionine, la glutathionylation, la persulfidation et la carbonylation des protéines. Au cours de la voie de peroxydation des lipides, plusieurs produits finaux sont formés, tels que des aldéhydes qui se lient aux protéines et altèrent leur activité. La figure est adaptée de [2, 90, 204].

## **CHAPITRE II**

### **PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS**

La teneur en carbonylation des protéines est largement utilisée comme marqueur pour déterminer le niveau d'oxydation des protéines dans les cellules animales et bactériennes. Bien que cette modification entraîne généralement une perte de la fonction des protéines, elle peut être régulatrice et peut activer des voies de signalisation impliquées dans la biologie des antioxydants et l'homéostasie cellulaire.

Chez les plantes, la formation de protéines carbonylées est l'un des principaux produits d'oxydation des protéines, considérés donc comme une accumulation des dommages oxydatifs. Elle peut être impliquée dans le processus du vieillissement ou de sénescence des plantes. Elle semble aussi s'accumuler dans tous les stades de développement et de germination des graines.

Cependant, les études du rôle potentiel de la carbonylation des protéines dans la transduction du signal chez les plantes sont limitées. Ces études sont importantes pour bien comprendre les mécanismes développés par les plantes pour bien résister au stress environnemental.

Dans le cadre de cette étude, nous avons émis l'hypothèse que la carbonylation des protéines pourrait servir dans la signalisation chez les plantes et plus spécifiquement dans le réseau de la signalisation de l'ABA.

Pour vérifier cette hypothèse, nous visons d:

- I. Étudier l'effet de l'acide abscissique sur la carbonylation des protéines.
- II. Identifier les processus physiologiques associés au protéome carbonylé en réponse à l'ABA.

Dans cette étude, pour mieux comprendre la fonction régulatrice de la carbonylation des protéines dans les plantes, nous avons examiné et détecter le protéome carbonylé dans les feuilles des plantes d'*Arabidopsis thaliana* traitées avec l'acide abscissique en utilisant des hydrazides fluorescentes qui réagissent spécifiquement avec les protéines carbonylées.

Ensuite, le profil des protéines carbonylées en réponse de l'ABA a été caractérisé par une chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem en dérivant les protéines avec une sonde réactive à aldéhyde.

Nos résultats ont montré que l'ABA induit non seulement la carbonylation de certaines protéines, mais empêche également la carbonylation de certaines protéines liées au stress qui étaient carbonylées dans les feuilles de plantes non traitées dans des conditions de croissance normales. L'implication de ces résultats pour le mode d'action de l'ABA dans les plantes a été discutée.

Un article intitulé « The phytohormone abscisic acid modulates protein carbonylation in *Arabidopsis thaliana* » présentant des différentes méthodes et résultats de ce projet a été rédigé et publié. L'article est mis dans la partie Publications.

## CHAPITRE III

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 1 Plantes et conditions de croissance

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* écotype Colombia-0 (Col-0) ont été utilisées comme type sauvage (WT) dans cette étude. Les graines des mutants d'insertion d'ADN-T pour les gènes *RbohD* (CS9555), *RbohF* (CS9557) et les mutants doubles *RbohD/F* (CS9558) ont été obtenus du Centre de Ressources Biologiques d'*Arabidopsis*.

Les graines des différents génotypes ont été soit semées directement dans des pots en plastique remplis de terre stérilisée à la vapeur, dont la surface est stérilisée pendant 10 minutes dans une solution de 70% (v/v) d'éthanol et 10% (v/v) d'eau de javel contenant 0,07% (v/v) de SDS avant d'être placées sur des boîtes de Pétri avec du milieu de culture du  $\frac{1}{2}$ x Murashige et Skoog ( $\frac{1}{2}$  x MS).

Les graines ont été stratifiées pendant deux jours dans l'obscurité à 4 °C pour rompre la dormance, puis transférées dans une chambre de croissance (cycles lumière/obscurité de 14/10 h ; lumière blanche de 80 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ; humidité relative de 60 % ; 22 °C pour la période de lumière /18 °C pour la période d'obscurité). Des plantes de quatre semaines cultivées dans le sol et des plantules de dix jours cultivés sur gélose ont été utilisées pour les traitements avec l'acide abscissique ABA et les traitements de stress, respectivement.

#### 2 Traitements

Pour le traitement avec l'acide abscissique (ABA). L'ABA (TCI America, Portland, USA) a été dissous dans du méthanol pour obtenir une solution mère de 100 mM. Une solution d'ABA (100 µM) contenant 0,02 % (v/v) de Tween-20 a été pulvérisée sur des plantes de quatre semaines cultivées dans le sol. La pulvérisation des plantes avec le même volume d'eau contenant 0,02 % (v/v) de Tween-20 et une trace de méthanol a servi de traitement témoin (la même quantité utilisée pour solubiliser l'ABA dans l'eau). Après 2 heures, les sections aériennes de 5 à 6 plantes ont été prélevées au hasard, combinées en un seul échantillon. Les échantillons sont immédiatement congelés dans l'azote liquide pour une

extraction immédiate des protéines ou un stockage à -80 °C jusqu'au moment de leur analyse. Dans chaque expérience, trois réplicats biologiques ont été utilisés.

Pour le traitement au NaCl et au mannitol, les graines stérilisées en surface ont été placées sur un milieu de culture de  $\frac{1}{2}$  x Murashige and Skoog medium (MS) complété par 25 mM et 100 mM de mannitol, 50 mM et 100 mM de NaCl pendant 10 jours avant d'être soigneusement prélevées avec une pince dans l'azote liquide. Les échantillons ont été extraits immédiatement ou stockés à -80 °C avant d'être analysés.

### 3 Extraction de l'ARN

Les ARN totaux ont été isolés à partir d'environ 100 mg de plantules d'*Arabidopsis*. Les tissus végétaux ont été broyés en une poudre fine sous azote liquide avec des billes métalliques et remis en suspension dans 500  $\mu$ l du tampon d'extraction (urée 6 M, LiCl 3 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 et EDTA 20 mM, pH 8,0). La suspension a été soigneusement mélangée et centrifugée pendant 5 min à 14000 rpm, 4 °C. Ensuite, un volume de la phase aqueuse a été mélangé avec un volume de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1). Le surnageant a été successivement réextrait avec un volume de phénol-chloroforme-alcool isoamylique et de chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Les ARN ont été précipités du surnageant en ajoutant 0,1 volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2) et 0,7 V volume d'isopropanol. Le mélange a été maintenu sur la glace pendant 5 minutes. Après centrifugation à 14000 rpm et 4 °C pendant 10 min, le culot d'ARN a été lavé deux fois avec de l'éthanol à 70% (v/v), séché et dissous dans 20-30  $\mu$ l d'eau eau Milli-Q.

La qualité et la concentration de l'ARN ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDropTM 1000 (Thermo Scientific, USA).

### 4 Analyses RT-PCR

L'ADNc a été synthétisé à partir de 2  $\mu$ g d'ARN total à l'aide d'un kit de transcription inverse d'ADNc (Transcriptase inverse SuperScript IV, ThermoFisher scientifique) selon les instructions du fabricant ; dans un volume total de 10  $\mu$ l, 1  $\mu$ l de désoxyribonucléase (ADNase) et 1  $\mu$ l du tampon de réaction (10x) ont été incubés avec 2  $\mu$ g d'ARN pendant 15 minutes à 37 °C dans un thermocycleur. La réaction a été stoppée avec 1  $\mu$ l de 50 mM

de EDTA à 65 °C pendant 10 minutes suivi d'autre incubation de 5 minutes avec 1 µL d'oligoDT pendant 65 °C. Ensuite, 4 µL du tampon de réaction (5x), 1 µL d'inhibiteur de ribonucléase (RNase) Ribolock, 2 µL de 10 mM de désoxyribonucléotide triphosphate (dNTPs) et 1 µL de transcriptase inverse ont été ajoutés à la réaction et incubés pendant une heure à 42 °C suivi d'une étape de désactivation à 70 °C pendant 5 minutes. La qualité de l'ADNc a été testée dans une PCR standard en utilisant le gène de référence Actine. 30 cycles d'amplification PCR ont été utilisés pour chacun des échantillons. Les produits d'amplification PCR ont été vérifiés sur un gel d'agarose à 1%.

## 5 Analyses PCR

Les réactions ont été homogénéisées et la PCR a été réalisée dans un thermocycleur. 30 cycles d'amplification PCR ont été utilisés pour chacun des échantillons. Le programme standard de PCR était le suivant :

94 °C      5 min dénaturation  
30 fois : 94 °C 30 sec dénaturation  
                  TA °C 30 sec liaison des amorces  
                  72 °C 45 sec élongation  
72 °C      5 min extension finale  
4 °C      Pour garder les échantillons stables jusqu'à leurs collections.

TA = Température de recuit =  $TM \pm 5$  °C.

TM = température de fusion des amorces. Pour les amorces ayant des TM différentes, la plus basse est considérée pour le calcul de la TA.

Tableau 3.1 Liste des séquences des amorces utilisées dans l'analyse transcriptomique

Symbole	Nom du gène	Amorces		Tm (°C)
		Séquence		
Actine	Actine	<i>Sens</i>	5'GAAACATTTCTGTGAACGATTCT3'	54,1
		<i>Anti-sens</i>	5'GGAATCCACGAGACAACCTATAAC3'	55,0
Zat 10	Doigt de zinc 10	<i>Sens</i>	5'TGACTTCGTCGCTCCGTTG3'	56,9
		<i>Anti-sens</i>	5'TTGCGCTCATGCTTCTCGCTC3'	57,8
Apx1	Ascorbate peroxydase 1	<i>Sens</i>	5'ACAGGGTCGTCCAATAGTGC3'	57,1
		<i>Anti-sens</i>	5'TCAGCTTGCTGGTGTGTGG3'	58,3
RBOHD	Respiratory burst oxidase homolog protein D	<i>Sens</i>	5'TGATAGCTTGTAGCCGAAGC3'	55,9
		<i>Anti-sens</i>	5'TCGTTCGGTGCTTATGTTGC3'	57,3
3i1	Aldehyde déshydrogénase 3	<i>Sens</i>	5'TAAGATCCCGTCCCCTGAAAAGC3'	62,0
		<i>Anti-sens</i>	5'CTACTGGATGTGCCTGAAGCATC3'	57,7
7b4	Aldéhyde déshydrogénase 7B4	<i>Sens</i>	5'GATATCTCGATTATCGTAGGCTCG3'	58,9
		<i>Anti-sens</i>	GAAGCAATAGCCAAAGACACACGC3'	54,1
COR47	Cold-Regulated 47	<i>Sens</i>	5'CGGAGCACGAGGAAGTGAAG3'	58,1
		<i>Anti-sens</i>	5'TTACAACCAACGGCGTGGAC3'	57,9

## 6 Détermination de la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Les niveaux de peroxyde d'hydrogène ont été déterminés selon Sergiev *et al.* [205]. De la poudre congelée (40 mg) de tissus de plantes d'*Arabidopsis thaliana*, âgées de 4 semaines traitées à l'ABA et d'échantillons non traités, a été directement homogénéisée dans 250 µl de tampon phosphate de potassium (10 mM, pH=7). L'homogénat a été centrifugé à 12 000×g pendant 15 min et 250 µl du surnageant a été ajouté à 250 µl d'acide trichloracétique (TCA) (0,1% (p:v)) et 500 µl de KI (1 M). L'absorbance du surnageant a été lue à 390 nm. La teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été calculée en utilisant une courbe gamme étalon réalisée par des concentrations connues de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 7 Extraction des protéines

À l'aide d'un mortier et d'un pilon, les tissus végétaux des plantules et des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* ont été broyés dans l'azote liquide et aliquotés dans des tubes Eppendorf de 1,7 ml. Les protéines totales ont été extraites de la poudre par centrifugation à 15 000×g pendant 10 minutes à 4 °C dans un tampon de lyse contenant 25 mM Tris-

HCl, pH=8,0, 0,1 % (v/v) de Triton X-100 et un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma) par centrifugation à 15 000×g pendant 10 minutes. Les concentrations de protéines ont été mesurées avec le réactif Bradford de Bio-Rad selon la méthode de Bradford [206].

## 8 Marquage des protéines carbonylées

### 8.1 Marquage des protéines carbonylées avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH).

#### 8.1.1 *Préparation des protéines marquées par le DNPH pour l'électrophorèse sur gel de SDS*

Les groupes carbonyles dans les chaînes latérales des protéines ont été dérivatisés en 2,4-dinitrophénylhydrazone (DNP) par réaction avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) comme décrit par Levine *et al.* [207].

Les extraits de protéines ont été mélangés avec un volume égal de 10 mM de DNPH préparé dans 10 N HCl. Le mélange est ensuite incubé à température ambiante pendant 1 heure à l'abri de la lumière avec agitation chaque 15 minutes.

Les protéines dérivées et non dérivées ont été précipitées avec 20% d'acide trifluoroacétique sous la glace pendant au moins 2 heures. Les échantillons ont été ensuite centrifugés durant 15 min à 15 000×g à 4 °C. Les culots de protéines ont été remis en suspension et lavés trois fois avec un mélange d'éthanol à 100% et d'acétate d'éthyle (1:1). Ensuite, ils ont été séchés à l'air avant d'être dissous dans le tampon de lyse des protéines. Dix µg d'extraits protéiques ont été mélangés avec un tiers du tampon Laemmli (4×), bouillis pendant 5 min à 95 °C et séparés par SDS-PAGE en utilisant des gels de polyacrylamide à 12,5%.

#### 8.1.2 *Essais immunologiques par immunobuvardage*

Les protéines ont été séparées par une électrophorèse SDS-PAGE à une seule dimension (1D-PAGE) et transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, Royaume-Uni) selon des procédures standard. Le transfert des échantillons par *immunobuvardage* a été vérifié par la coloration des protéines totales de la membrane de nitrocellulose avec du Ponceau-S. Les blots ont été rincés une fois pendant 5 min dans 2 mM Tris-HCl; 150 mM

NaCl ; pH 7,50 ; 0,1 % (v/v) de Tween 20 (TBST), puis incubés pendant 1 h à température ambiante dans une solution de blocage (10%) avec de la poudre du lait dissoute dans TBST. Après une incubation d'une heure avec des anticorps anti-DNP de lapin dans du TBST avec du lait, la membrane a été lavée trois fois dans du TBST et incubée pendant 1 h avec des anticorps secondaires anti-Anticorps IgG conjugués à de la peroxydase de raifort. Les anticorps liés ont été visualisés à l'aide du kit ECL (GE Healthcare, Royaume-Uni). Les immunoblots ont été visualisés par le scanner Azure Biosystems (Azure Biosystems, USA) et la version du logiciel Azure Capture Software (Azure Biosystems, USA).

## 8.2 Marquage des protéines carbonylées avec des sondes fluorescentes

### 8.2.1 *Préparation des échantillons*

Les échantillons protéiques ont été marqués avec des sondes fluorescentes des cyanines dérivées d'hydrazides 5.5 (Cy5.5 ; excitation/émission : 684/710) et cyanine 7.5 (Cy7.5 ; excitation/émission, 788/808) (Lumiprobe USA) et diluées dans du diméthylsulfoxyde pour obtenir une solution mère de 10 mM. Dans une solution de réaction contenant de l'acétate de sodium (0,1 M pH 6,8), 0,1 % de SDS et 1 mM d'EDTA, 140 g de protéines ont été combinés avec 500 pmol/l de la sonde fluorescente pour le marquage. La réaction a été arrêtée avec du cyanoborohydrure de sodium (12 mM) à température ambiante pendant 15 minutes après avoir été incubée à température ambiante pendant 1 heure à 500 rpm. Toutes les procédures ont été réalisées dans l'obscurité totale.

Les protéines ont ensuite été précipitées pendant au moins 2 heures avec un volume égal d'acide trichloracétique (TCA) froid à 20% (v/v) et centrifugées à 15 000×g pendant 5 minutes à 4 °C. Pour se débarrasser de l'excès des colorants fluorescents non liés, les culots de protéines ont été remis en suspension et lavés trois fois avec un mélange d'éthanol à 100% et d'acétate d'éthyle (1:1). Ensuite, ils ont été séchés à l'air avant d'être dissous dans le tampon de lyse des protéines. Le test de Bradford a été utilisé pour déterminer la nouvelle concentration de protéines dans chaque échantillon [206].

### 8.2.2 *Électrophorèse sur gel et détection par fluorescence*

Les protéines marquées ont été séparées par SDS-PAGE à une seule dimension sur des gels de résolution de polyacrylamide à 12,5 % (p/v) [208]. Selon les instructions du fabricant, les gels ont été fixés pendant 2 heures à température ambiante avec la solution de fixation Azure A (Azure Biosystems, USA). Les protéines totales ont été colorées pendant 2 heures à température ambiante avec de l' Azure Red (excitation/émission : 520/610) diluée dans une solution de coloration Azure B (Azure Biosystems, USA) avec une légère agitation selon les instructions du fabricant. L'image du gel a été prise avec le scanner Azure Biosystems (Azure Biosystems, USA) et la version du logiciel Azure Capture Software (version 1.2.1228.0; Azure Biosystems, USA). La fluorescence de l'azure Red, du Cy5.5 et du Cy7.5 a été mesurée en utilisant respectivement les lasers vert (520 nm), rouge (658 nm) et infrarouge proche (784 nm). L'intensité de fluorescence en unités arbitraires pour chaque puits de gel a été déterminée par le logiciel Azure Spot puis téléchargée dans Excel. Les données ont été normalisées en divisant l'intensité de la fluorescence des échantillons marqués au Cy5.5 ou au Cy7.5 correspondants aux protéines carbonylées par l'intensité de la fluorescence de l'Azure Red, correspondant aux protéines totales. Les valeurs moyennes arithmétiques et l'écart-type ont été déterminés pour chaque échantillon.

## **9 Identification des protéines carbonylées par LC/MS-MS**

### **9.1 Enrichissement des protéines carbonylées avec une suspension d'agarose à l'avidine**

L'identification des protéines carbonylées est réalisée par une chromatographie en phase liquide couplée avec une spectrométrie de masse en tandem. Pour ce faire, les protéines carbonylées ont été marquées préalablement par une sonde réactive à l'aldéhyde (ARP) contenant de biotine (Chavez et al. 2006 ; Tzeng et Maier 2016). Les extraits protéiques ont été incubés pendant 2 heures à température ambiante à 500 rpm avec 5 mM d'ARP (Dojindo Laboratories, Japon). L'excès d'ARP est éliminé à l'aide d'un équipement de centrifuge d'ultrafiltration (Millipore, Irlande). L'enrichissement des échantillons marqués à l'ARP a été effectué avec une résine d'avidine monomère (Thermo Fisher Scientific, USA). En résumé, 200 µl de suspension d'agarose d'avidine monomère Pierce™ sont

déposés sur une colonne de spin de 0,5 ml (Thermo Fisher Scientific, USA) et préparés selon les instructions du fabricant. La résine a été équilibrée avec 150  $\mu$ L de solution saline tampon phosphate (PBS) à pH 7 et rincée trois fois avec le même tampon. Les sites de liaison non réversibles de la biotine ont été bloqués avec 300  $\mu$ l de 2 mM de D-biotine préparée dans le PBS, pH 7, puis lavés deux fois avec 600  $\mu$ l de 0,1 mM de glycine, pH 2,8 et 400  $\mu$ l de PBS. Ensuite, le volume de l'échantillon de protéines a été ajusté à 200  $\mu$ l avec du PBS avant d'être ajouté à la résine et incubé pendant 1 heure à température ambiante avec une légère agitation. La colonne est lavée 5-6 fois avec du PBS et les protéines marquées à l'ARP ont été élues trois fois avec 150  $\mu$ l de 0,1 mol/l glycine, pH 2,8. Un temps d'incubation de 5 minutes a été effectué après chaque ajout de la solution d'élution. Les fractions ont été neutralisées avec 3-5  $\mu$ l de Tris-Cl (1 M, pH 8.0) puis regroupées, concentrées dans un speedVac et stockées à -80 °C avant toute analyse ultérieure.

Les protéines purifiées marquées avec de l'ARP ont été dénaturées avec 1% (p/v) de désoxycholate, réduites avec 5 mM de Tris-(2-carboxyéthyl)-phosphine à 60 °C pendant 30 minutes à 550 rpm, et alkylées avec 10 mM d'iodoacétamide dans l'obscurité à 37 °C pendant 30 minutes avant d'être digérées avec de la trypsine. 20  $\mu$ g de protéines ont été digérés pendant 16 heures à 22 °C et 550 rpm avec 2  $\mu$ g de Trypsin Gold (Sequencing grade, Promega, USA). Les échantillons de peptides ont été dessalés à l'aide de tubes à centrifuger Agilent Peptide Cleanup C18 (Agilent, États-Unis), puis séchés dans un speedVac conformément aux recommandations du fabricant.

## 9.2 Analyse par spectrométrie de masse

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par la Plateforme de protéomique du Centre de recherche du CHU de Québec (Québec, Qc, Canada). Les peptides dessalés ont été analysés par nanoLC/MSMS en utilisant un système de chromatographie Dionex UltiMate 3000 nanoRSLC (Thermo Fisher Scientific, USA) connecté à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Les peptides ont été piégés à 20  $\mu$ l/min dans le solvant de chargement (acétonitrile à 2 %, TFA à 0,05 %) pendant 5 minutes sur une pré-colonne de cartouche

pepmap C18 de 5 mm x 300 µm (Thermo Fisher Scientific / Dionex Softron GmbH, Germering, Allemagne). Ensuite, les peptides ont été élusés avec un gradient linéaire de 5 à 40 % de solvant B (A : 0,1% d'acide formique, B : 80% d'acétonitrile, 0,1% d'acide formique) pendant 90 minutes en utilisant une pré-colonne qui a été commutée en ligne avec une colonne de séparation Pepmap Acclaim (ThermoFisher) de 50 cm x 75 m de diamètre interne à 300 nL/min pour un temps de passage total de 2 heures. Le logiciel Thermo XCalibur version 4.3.73.11 a été utilisé pour collecter les spectres de masse en mode d'acquisition dépendant des données. L'orbitrap a été utilisé pour capturer des spectres de masse à balayage complet (350 à 1800 m/z) avec une cible AGC de 4e5, un temps d'injection maximal de 50 ms et une résolution de 120 000. Un étalonnage interne utilisant la masse de verrouillage sur l'ion siloxane m/z 445.12003 a été utilisé. Chaque balayage MS était suivi de la fragmentation MSMS des ions les plus intenses pour un temps de cycle total de 3 secondes (mode top speed). Les ions ont été isolés à l'aide d'un analyseur quadripolaire dans une fenêtre de 1,6 m/z et fragmentés par la dissociation induite par collision à plus haute énergie (HCD) avec une énergie de collision de 35 %. Les fragments résultants ont été détectés par le piège à ions linéaire en vitesse de balayage rapide avec un temps d'injection maximum de 50 msec et une cible AGC de 1e4. L'exclusion dynamique des peptides précédemment fragmentés a été réglée pour une période de 20 secondes avec une tolérance de 10 ppm.

### 9.3 Recherche dans les bases de données

Les listes de pics MS/MS au format générique Mascot (MGF) ont été élaborées à l'aide du logiciel Proteome Discoverer 2.3 (Thermo). Ensuite, les fichiers MGF ont été analysés à l'aide du moteur de recherche Mascot (Matrix Science, Londres, Royaume-Uni ; version 2.5.1). Mascot a été programmé pour effectuer des recherches dans une base de données de contaminants ainsi que dans la base de données de référence Uniprot d'*Arabidopsis thaliana* (septembre 2020 ; 39449 entrées) en considérant une digestion à la trypsine. La recherche dans Mascot a été effectuée avec une tolérance de masse de l'ion fragment de 0,60 Da et une tolérance de l'ion parent de 10,0 ppm. Le carbamidométhyle de la cystéine a été défini comme une modification fixe dans Mascot. La désamidation de l'asparagine

et de la glutamine, ainsi que l'oxydation de la méthionine, ont été décrites comme des modifications variables dans Mascot. Deux clivages manqués étaient autorisés. Scaffold (version Scaffold\_5.0.1, Proteome Software Inc., Portland, OR) a été utilisé pour valider les identifications de peptides et de protéines basées sur le MS/MS. Pour les peptides et les protéines, un taux de fausse découverte de 1 % a été appliqué. Pour satisfaire aux règles de parcimonie, les protéines ayant des peptides identiques et ne pouvant être différencierées sur la base de la seule analyse MS/MS ont été regroupées.

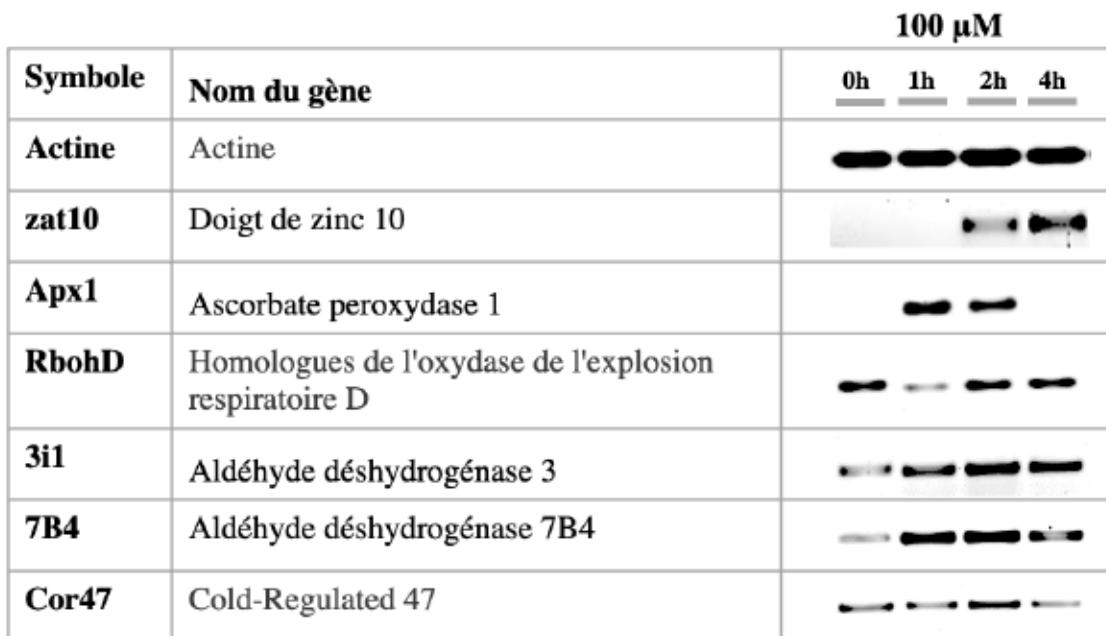
## CHAPITRE IV

### RÉSULTATS

#### 1 Effet de l'acide abscissique (ABA) exogène sur l'expression des gènes sensibles au stress

L'ABA est une phytohormone essentielle qui est maintenue à de faibles niveaux dans les plantes en conditions non stressantes. La concentration basale d'ABA est essentielle pour le métabolisme primaire, la croissance et le développement des plantes [209]. Il a été démontré que l'acide abscissique (ABA) est impliqué dans la régulation de nombreux gènes induits par le stress.

**Tableau 4.1** Expression des gènes du stress suite au traitement avec 100  $\mu$ M d'acide abscissique dans des plantules d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 14 jours. Le tableau montre une analyse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR.

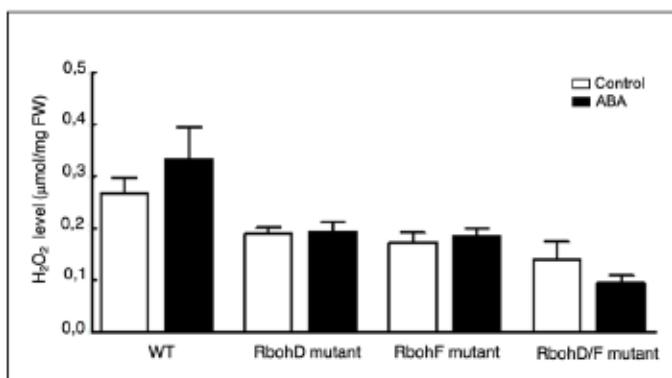


C'est pourquoi nous avons traité des semis d'*Arabidopsis* âgés de 14 jours de l'écotype Columbia (Col-0) avec 100  $\mu$ M d'ABA pendant 0h, 1h, 2h et 4h et avons effectué une analyse transcriptomique de RT-PCR. Les résultats ont montré que la plupart de ces gènes étaient clairement induits par le traitement ABA après 1 ou 2 heures de traitement avec

l'ABA. À partir de ces résultats, 2 heures de traitement à l'ABA a été choisi pour le reste des expériences.

## 2 Dosage de ROS

Chez les plantes, la production de ROS en réponse à un stress biotique et abiotique permet aux plantes d'établir différents mécanismes de défense. L'acide abscissique augmente les niveaux de ROS dans les cellules de garde [210, 211]. Les protéines de Rbohs sont considérées comme le système enzymatique prédominant qui est responsable de la production des ROS. Nous avons donc étudié la génération de ROS dans *Arabidopsis thaliana* lors d'un traitement avec 100 mM d'ABA.



**Figure 4.1** Quantification de la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des tissus d'*Arabidopsis thaliana*. La teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été calculée en utilisant une courbe gamme étalon réalisée par des concentrations connues de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette méthode est basée sur une réaction catalysée par la peroxydase (POD) dans laquelle l'iodure de potassium (KI) est oxydé pour générer du I<sub>3</sub><sup>-</sup> stable de couleur jaune. L'absorbance du I<sub>3</sub><sup>-</sup> généré à 350 nm et 400 nm présentait de bonnes relations linéaires avec la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Des analyses similaires avec les simples mutants *RbohD*, *RbohF* et le double mutant *RbohD/F* ont été effectuées afin de vérifier la contribution de *RbohD* et *RbohF* à la production de ROS lors des réponses au traitement avec l'ABA.

Pour les plantes non traitées, le type sauvage a montré une plus grande production de ROS par rapport aux mutants. Le traitement d'*Arabidopsis thaliana* avec 100 μM d'ABA a induit une augmentation des niveaux de ROS par rapport à l'échantillon témoin. Cette induction a été diminuée chez tous les mutants. Comme le montre la figure 4.1, la production de ROS en réponse à l'ABA dans le mutant *RbohD* et *RbohF* a montré une petite différence d'augmentation par rapport à la réponse dans leurs correspondants

échantillons de contrôle. La production de ROS dans le double mutant *RbohD/F* était partiellement réduite dans les plantes témoins par rapport aux mutants simples *RbohD* et *RbohF* et clairement altérée par rapport à son échantillon témoin. Ces résultats montrent que la double mutation de *RbohD* et *RbohF* contribue à l'augmentation de l'insensibilité à l'ABA et prouvent alors que *RbohD* et *RbohF* présentent un chevauchement de leurs fonctions dans la réponse à l'ABA dans les cellules de garde.

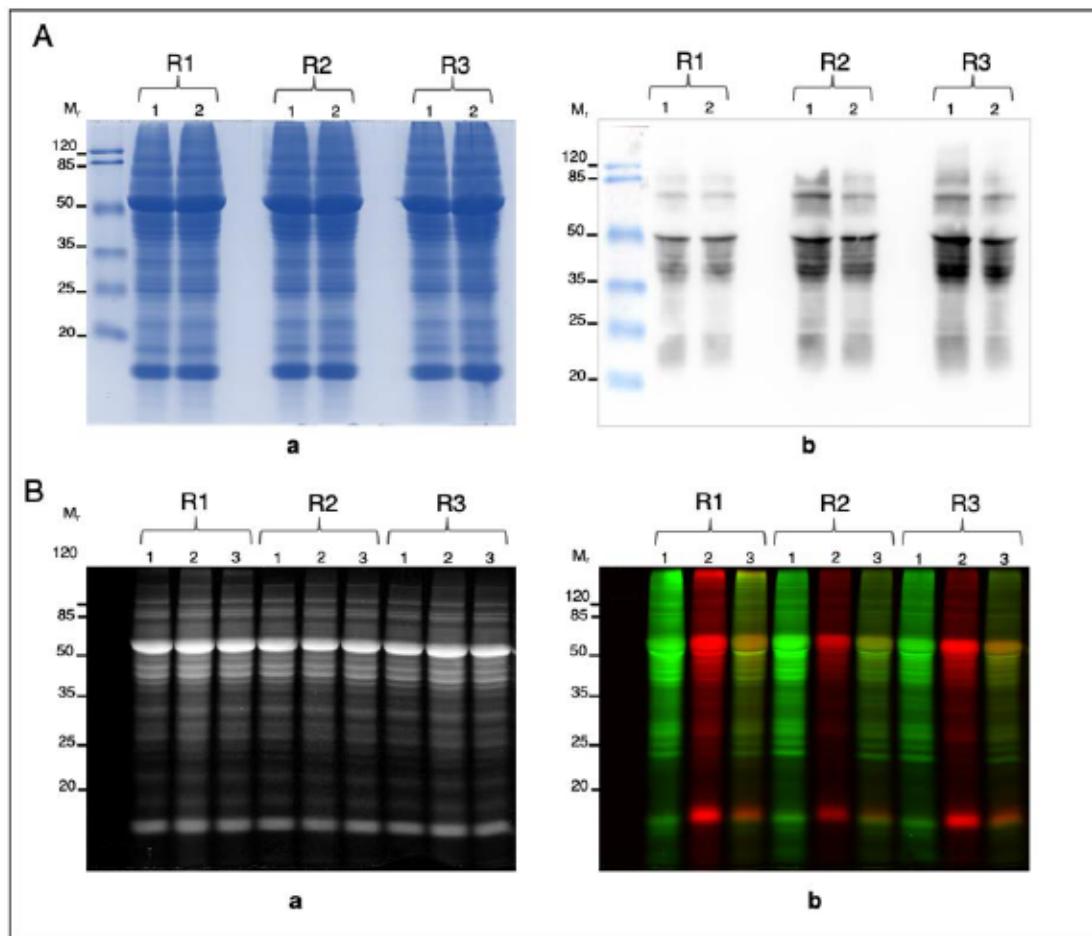
### 3 Sélection du protocole de marquage au carbonyle des protéines

Pour étudier les effets de l'ABA exogène sur la carbonylation des protéines, des plantes de quatre semaines d'*Arabidopsis thaliana* ont été pulvérisées avec 100 µM d'acide abscissique (ABA) pendant 2 heures ensuite le profil des protéines carbonylées a été examiné. Les protéines carbonylées dans les échantillons de feuilles des plantes traitées à l'ABA ont été d'abord analysées sur des gels de polyacrylamide à 12,5%.

Les échantillons témoins et traités à l'ABA ont été analysées en premier lieu par immunobuvardage pour les protéines modifiées par le DNPH et de même avec deux sondes fluorescentes sensibles à la carbonylation. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'une seule dimension. Les analyses de la carbonylation ont été effectuées en triplicata.

Comme le montre la figure 4.2.A, on a constaté une variation dans les profils de carbonylation dans les 2 méthodes de détection de carbonylation. D'après ces résultats (figure 4.2.A), nous avons constaté que la méthode de dérivatisation avec le DNPH contient plusieurs limitations techniques. Les profils de carbonylation des protéines sur un seul Western blot sont rarement entièrement reproduits, ce qui rend difficile l'identification et la quantification des protéines carbonylées qui ont changé entre les échantillons témoins et ceux traités par l'ABA. Ces problèmes limitent la précision de la quantification de la carbonylation. Pour les prochaines analyses, on a opté la méthode de détection des protéines carbonylées par les sondes fluorescentes.

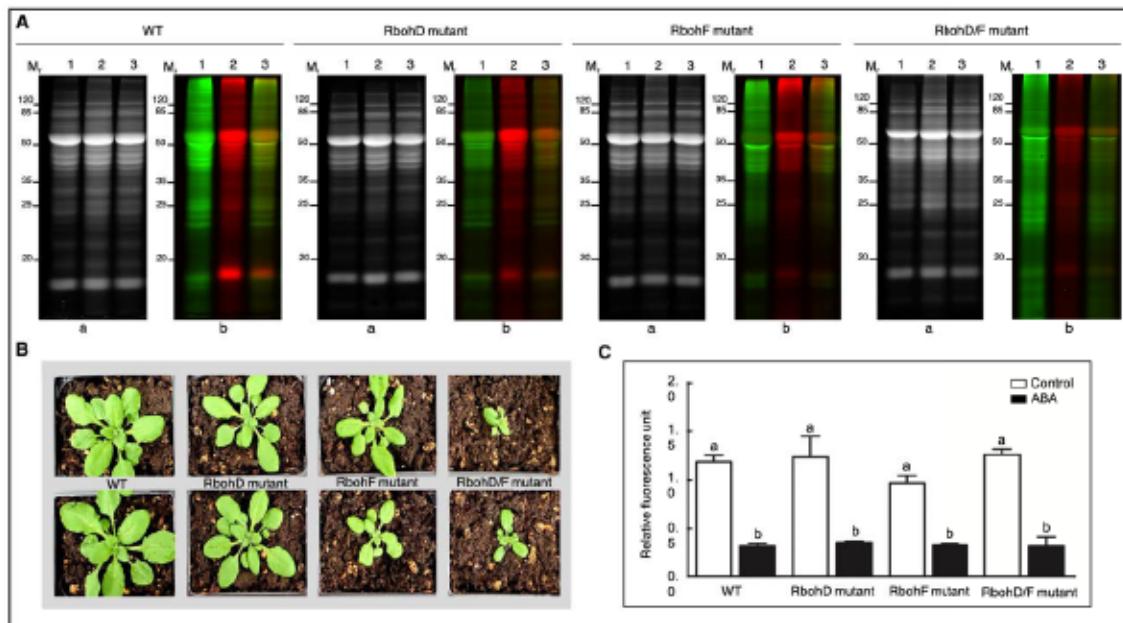
La sélectivité des dérivés d'hydrazide vis-à-vis des groupes carbonyles et l'existence d'une large gamme de groupes fonctionnels couplés à l'hydrazide permettent de concevoir de nouvelles méthodologies pour la détection et la quantification des protéines carbonylées.



**Figure 4.2** Analyse du protéome carbonylé induit par l'ABA par deux méthodes différentes : 10 µg de protéines provenant des plantes d'*Arabidopsis thaliana*, âgés de 4 semaines et traitées avec ou sans 100 µM d'acide abscissique (ABA) pendant 2 heures ont été dérivatisés et chargés dans chaque puits. A : Analyse du protéome carbonylé par SDS-PAGE après marquage des protéines carbonylées avec le 2,4-dinitrophénolhydrazine (DNPH) ; (a) : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (1D SDS-PAGE) des protéines totales. (b) : Analyse par immunobuvardage des protéines carbonylées des plantes témoins (Puits 1) et des plantes traitées avec ABA (Puits 2). B : Analyse du protéome carbonylé par SDS-PAGE (1D SDS-PAGE) après marquage des protéines carbonylées avec des sondes fluorescentes : Les protéines d'échantillons témoins (Puits 1) ont été marquées avec Cy5,5 et les protéines d'échantillons traités avec l'ABA (Puits 2) ont été marquées avec Cy7,5. (a) : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS des protéines totales marquées avec AzureRed, (b) : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS des protéines carbonylées. Puits 1 : des plantes témoins, puits 2 : des plantes traitées avec ABA, puits 3 : 5 µg de chaque échantillon ont été mélangés et chargés dans le puits.

#### 4 Analyse du protéome carbonylée induite par l'ABA par SDS-PAGE

Les protéines carbonylées dans les échantillons de feuilles des plantes traitées à l'ABA ont été d'abord analysées sur des gels de polyacrylamide comme mentionné précédemment. Les échantillons témoins et traités à l'ABA ont été marqués avec deux sondes fluorescentes sensibles à la carbonylation.

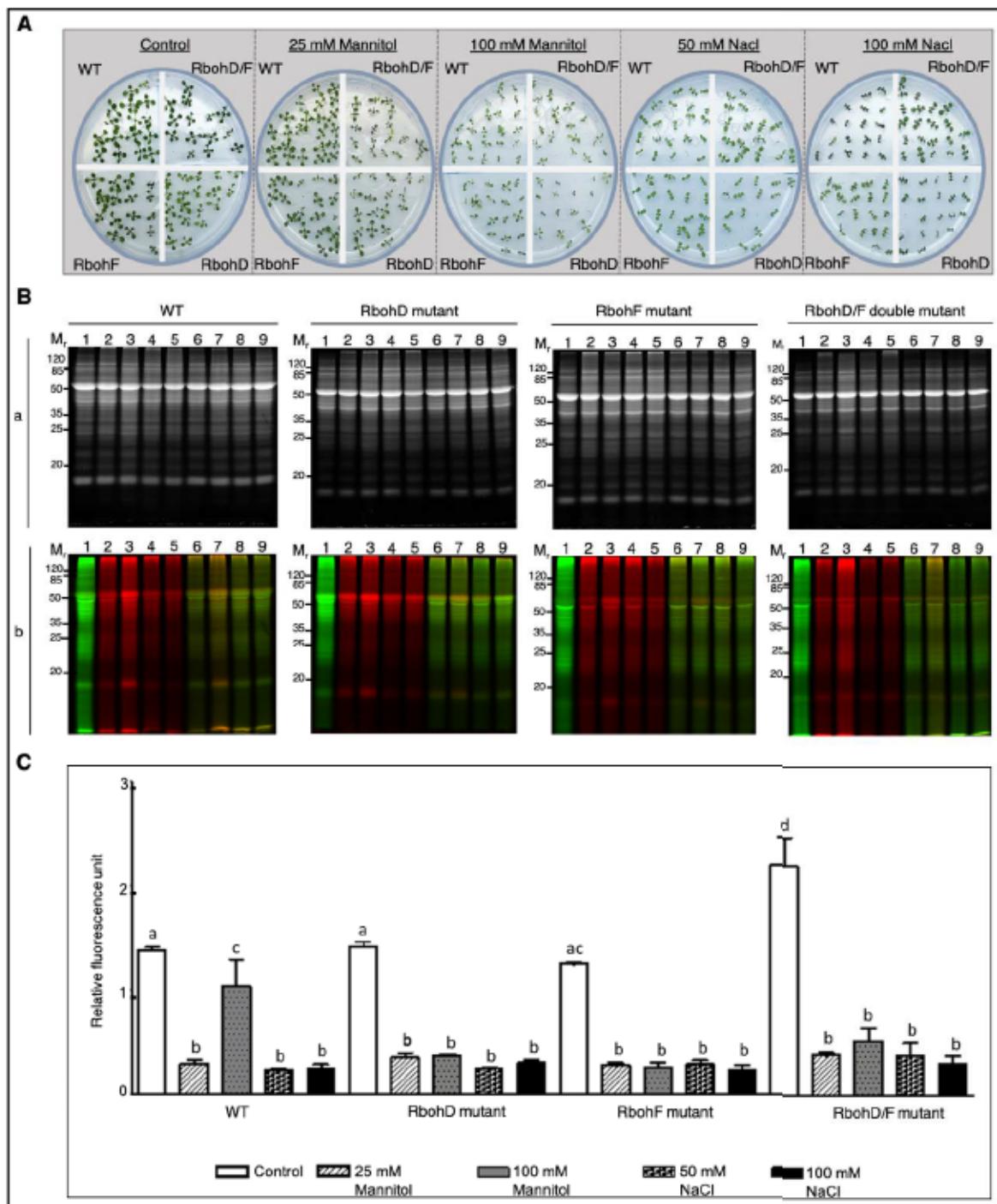


**Figure 4.3 Analyse du protéome carbonylée induite par l'ABA par 1D SDS-PAGE :** 10 µg de protéines provenant des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des plantes de type sauvage (WT), les mutants simples *RbohD* et *RbohF* et le double mutant *RbohD/F* âgés de 4 semaines et traitées avec ou sans 100 µM d'acide abscissique (ABA) pendant 2 heures, ont été dérivatisés et chargées dans chaque puits. **A :** Analyse du protéome carbonylée par 1D SDS-PAGE après marquage des protéines carbonylées avec des sondes fluorescentes : Les protéines d'échantillons témoins ont été marquées avec Cy5,5 et les protéines d'échantillons traités avec l'ABA ont été marquées avec Cy7,5. **(a)** : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS des protéines totales marquées avec AzureRed, **(b)** : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS des protéines carbonylées. Puits 1 : des plantes témoins, puits 2 : des plantes traitées avec ABA, puits 3 : 5 µg de chaque échantillon ont été mélangés et chargés dans le puits. **B :** Plantes représentatives de 4 semaines des plantes de type sauvage (WT), les mutants simples *RbohD* et *RbohF* et le double mutant *RbohD/F*. **C :** Abondance relative des protéines carbonylées basée sur l'intensité de fluorescence des sondes réactives aux carbonyles. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes et représentent les moyennes ± SEM (n = 3). Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à p <0,001, ANOVA à sens unique et test post hoc de Tukey.

La comparaison de l'intensité de la fluorescence a révélé une diminution importante du niveau de protéines carbonylées dans les échantillons provenant des plantes de type sauvage (WT) traitées à l'ABA par rapport aux plantes témoins. Quelques bandes distinctes ont pu être observées dans les échantillons témoins et traités à l'ABA, indiquant un changement dans le protéome carbonylé dans la feuille lors de l'exposition à l'acide abscissique (Fig. 4.3.C). Il a été démontré que la signalisation de l'ABA dans les cellules de garde implique la production de  $H_2O_2$  par les protéines *RbohD* et *RbohF* et qu'elle est influencée par les espèces réactives carbonylées (RCS) en aval de  $H_2O_2$  [88, 186]. Dans ce sens, nous avons examiné les protéines carbonylées dans les mutants simples et doubles mutants des gènes *RbohD* et *RbohF*. L'intensité de fluorescence était similaire entre les échantillons WT et mutants non traités et diminuait de manière similaire lors du traitement à l'ABA. Ces observations suggèrent une diminution du niveau de protéines carbonylées dans les plantes après traitement à l'ABA.

Cela contrastait avec l'augmentation souvent observée des protéines carbonylées dans les plantes stressées dans la littérature. Pour vérifier si la baisse des niveaux de protéines carbonylées dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* traitées à l'ABA était physiologiquement significative, nous avons examiné les protéines carbonylées dans les plantes WT et les mutants *RbohD/F* soumis à des traitements de stress légers (Figure 4.4.A et Figure S1).

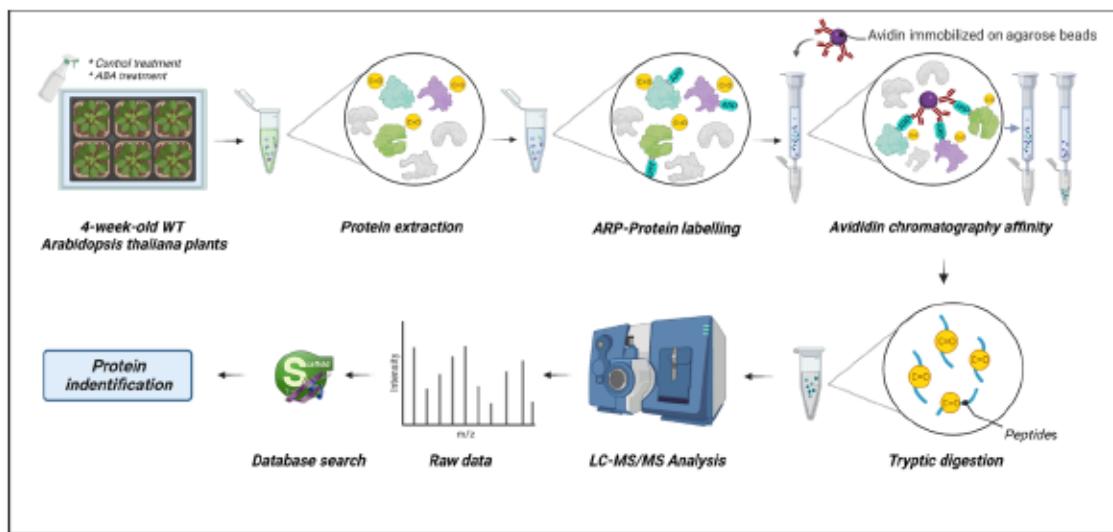
On a constaté que le stress osmotique a abouti à un rétrécissement des feuilles des plantes WT et mutantes *RbohD/F*. Une réduction visible de la croissance a été observée avec 25 mM de mannitol dans tous les génotypes tandis que le traitement avec 100 mM de mannitol a induit un retard de croissance important. L'effet le plus sévère a été observé chez le mutant *RbohD* par rapport aux WT, mutants *RbohF* et *RbohD/F*. Le traitement avec 50 et 100 mM NaCl a également ralenti la croissance de tous les génotypes, mais l'effet était plus prononcé chez les mutants WT et *RbohD*. L'intensité de fluorescence relative des sondes carbonylées a diminué simultanément dans les plantes de type sauvage et mutants soumises aux traitements de stress léger, comme nous l'avons observé dans les plantes traitées à l'ABA (Figure 4.3 et Figures S1→S5).



**Figure 4.4** Analyse du protéome carbonylé induit par des traitements de stress légers par SDS-PAGE<sup>1</sup>.

## 5 Détection des protéines carbonylées induites par l'ABA par LC-MS/MS

### 5.1 Approche



**Figure 10.5** Aperçu du flux de travail expérimental pour le marquage sélectif des protéines carbonylées dans l'extrait protéique.

L'enrichissement des protéines carbonylées peut se faire au niveau des peptides [212, 213] ou au niveau des protéines [214, 215].

<sup>1</sup> A : Phénotype des plantules d'*Arabidopsis thaliana* de type sauvage, les mutants simples de *RbohD* et *RbohF* et le double mutant *RbohD/F* cultivées sur un milieu de  $\frac{1}{2}$  x Murashige et Skoog ( $\frac{1}{2}$ x MS) avec ou sans traitements de stress pendant 10 jours. B : Figures des gels représentant les protéines carbonylées et les protéines totales : Les figures (a) montrent des gels représentant les protéines carbonylées marquées avec des hydrazides fluorescents: L'échantillon témoin a été marqué avec Cy5,5 et les échantillons de stress avec Cy7,5. Les gels (b) représentent les protéines totales marquées avec AzureRed : Puits 1, échantillons de contrôle ; puits 2-5, échantillons de plantules exposées respectivement à 25 mM de mannitol, 100 mM de mannitol, 50 mM de NaCl et 100 mM de NaCl ; puits 6-9, mélange de quantités égales (5 µg) d'échantillons de contrôle et chacun des traitements du stress, dans le même ordre que pour les voies 2 à 5. C : Abondance relative des protéines carbonylées. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes et représentent les moyennes  $\pm$  SEM (n=3). Des différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes à  $p < 0,001$ , ANOVA à sens unique, test post hoc de Tukey.

Lors de la recherche de cibles de la carbonylation primaire des protéines, les deux approches peuvent être employées où la masse exacte de la chaîne latérale de l'acide aminé oxydé est connue et peut être fournie comme modifications variables lors de la recherche de la base de données peptidiques [143]. Cependant, pour les protéines carbonylées dérivées de l'addition des espèces réactives carbonylées (RCS) à certaines chaînes latérales d'acides aminés (carbonylation secondaire des protéines), l'identité de ces RCS qui ont provoqué leur modification est inconnue.

Étant donné que cette information n'est pas disponible pour les protéines extraites d'un tissu, l'enrichissement au niveau des peptides ne peut pas être utilisé pour identifier précisément les protéines carbonylées dérivées des RCS extraites de ce tissu. Néanmoins, l'enrichissement au niveau des protéines permet de surmonter cette limitation suivie d'une digestion tryptique et une analyse LC-MS/MS. Les protéines ont été identifiées sur la base des peptides non modifiés. Dans ce cas, si l'enrichissement est effectué au niveau des peptides, les protéines qui leur correspondent ne peuvent pas être identifiées. Par exemple, les RCS qui carbonylent les protéines *in vivo* après un traitement à l'ABA sont inconnus et il n'est pas clair si l'ABA déclenche seulement un ou les deux types de carbonylation des protéines. Pour ce faire, nous avons adopté l'enrichissement au niveau des protéines dans cette étude (Figure 4.5).

Lors de l'enrichissement par chromatographie d'affinité, de nombreuses protéines non spécifiques peuvent être coenrichies par une colonne d'avidine monomérique. Pour cette raison, des extraits de protéines d'échantillons témoins et traités à l'ABA qui n'ont pas été marqués à l'ARP ont été analysés en parallèle avec les échantillons analysés précédemment. Pour améliorer la crédibilité de l'identification de la protéine carbonylée, l'ensemble de données MS a été filtré sur la base de l'élimination de la protéine identifiée dans les échantillons non marqués. Seules les protéines trouvées dans les échantillons marqués avec l'ARP mais non découvertes dans les échantillons non marqués ont été prises en compte.

### 1.1 Détection des protéines carbonylées induites par l'ABA

Les protéines carbonylées marquées avec la sonde réactive au carbonyle (ARP) ont été collectées et analysées par LC-MS/MS afin d'étudier plus en détail les changements dans le protéome carbonylé des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* induit par l'ABA. Les résultats ont été analysés par rapport au changement de l'état de carbonylation des protéines entre le contrôle et les traitements avec l'acide abscissique (ABA). Il convient de noter que l'approche utilisée ici n'a permis que la détection des peptides carbonylés, mais pas leur quantification relative. Parmi celles-ci, 163 et 26 protéines ont été identifiées par LC-MS/MS dans trois réplicats biologiques des échantillons de plantes témoins et celles traitées à l'ABA, respectivement (figure 4.6; tableaux S.1 à S.5). Neuf protéines carbonylées ont été identifiées simultanément dans les deux groupes d'échantillons. Au total, 365 et 124 protéines ont été identifiées dans les échantillons témoins et traités à l'ABA, respectivement, après une vérification manuelle de la probabilité des peptides des données (tableaux S.6 à S.17 de l'annexe). Le nombre de protéines carbonylées identifiées dans les échantillons non traités était plus élevé que le nombre de protéines carbonylées détectées dans les plantes traitées à l'ABA, ce qui était cohérent avec nos résultats dans la Figure 4.3.



**Figure 4.6** Diagramme de Venn des protéines carbonylées dans les échantillons témoins et les échantillons traités à l'ABA.

Les tableaux 1 et 2 énumèrent quelques protéines carbonylées identifiées dans les échantillons témoins et ceux traités à l'ABA, respectivement.

**Tableau 4.2 Exemples des protéines carbonylées sélectionnées dans les échantillons de plantes témoins**

Gene reference number	Protein name	Accession number	Molecular mass (kDa)	Localization	Peptide sequence	m/z	Charge	% coverage
<b>A. Amino acid biosynthetic and metabolic process</b>								
<i>AT5G08590</i>	Aspartokinase 2 (ASK2)	<i>O23653</i>	59,6	Nucleus	(K)NSYNPTAPGTVITR(S) (R)GGSDLTTATIGK(A) (K)FGGSSVESAER(M)	745,88 560,80 563,26	2 2 2	7
<i>AT2G17265</i>	Homoserine kinase (HSK)	<i>Q8L7R2</i>	38,52	Plastid	(K)VSGYHADNIAAPAIMGGFVLIR(N) (K)ITAPATVANLGPGLPFDLGLGD HVTLR(V) (R)SVGLSLDLHK(G) (R)NcAGIAIAIATMK(M) (K)GLPLGSGLGSAAASAAAAAVAVNEIF GR(K) (R)AGEVSISETITGTTTK(L)	734,39 1 063,53 534,81 610,81 1 257,67 747,39	3 3 2 2 2 2	35
<i>AT5G11520</i>	Aspartate aminotransferase 3 (ASP3)	<i>P46644</i>	48,95	Peroxisome	(K)LNLGVGAYR(T) (R)KAEQQLINDR(T) (R)ITTVEdLSGTGSLR(V)	481,77 607,83 747,38	2 2 2	7
<i>AT4G33680</i>	LL-diaminopimelate aminotransferase (DAP)	<i>Q93ZN9</i>	50,39	Plastid	(R)LQVMFGSnVTLAVQDPSYPAYVDSSVI mGQTGQFNTDVQK(Y) (R)EQLTQLVEFAK(K) (K)THVVTTPGSGFPGGEGFVR(V) (K)AAADSAGVNIVPISFGSAGEDGQR(V)	1 451,36 653,36 979,99 1 109,54	3 2 2 2	15
<i>AT2G44040</i>	4-hydroxytetrahydrodipicolinate reductase 1 (DAPB1)	<i>O80574</i>	37,54	Plastid	(K)KVGVPFVMMGTTGGDR(N)	696,85	2	11
<i>AT1G31180</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase (ATIMD3)	<i>A0A1P8AU M8</i>	45,77	Plastid	(K)QSDAIIILGAIGGYK(W) (R)DLNVFANLRPATVLPQLVDASTLK(K) (R)GITINENGEEVGFTNTIEYAAHEIDR(I) (K)ANVLDASILWR(K) (K)ANPLATILSAAMLLK(Y)	703,39 865,82 931,11 629,35 763,95	2 3 3 2 2	23
<b>B. Glycolic process</b>								
<i>AT2G36460</i>	Fructose-bisphosphate aldolase 6 (AtPBA6)	<i>Q9SJQ9</i>	38,38	Cytosol	(K)VAPEVIAEHTVR(A) (K)AQEAFLVR(C) (K)ANSEATLGAYK(G)	440,91 467,26 562,78	3 2 2	47
<i>AT5G54960</i>	Pyruvate decarboxylase 2 (PDC2)	<i>Q9FFT4</i>	65,81	Cytosol	(R)ILHHHTIGLPDFTQELR(C) (K)VSNQIGLDAAVEAAAEEFLNK(A)	630,67 1 030,53	3 2	11
<i>AT5G56630</i>	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 7 (PFK7)	<i>Q9CSJ7</i>	53,48	Cytosol	(R)EVVSSLISYMYGVK(R) (R)GINQVYIIGGDTQQR(G) (R)ITETQNNVVITDR(M)	731,370 795,917 751,894	2 2 2	16
<i>AT1G12000</i>	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phototransferase subunit beta 1 (PPF-BETA)	<i>Q8W4M5</i>	61,46	Golgi	(R)ASVYSEVQSSR(I) (K)IVEGPASSAAAGNPDEIAK(L)	606,796 863,43	2 2	9
<b>C. Protein folding</b>								
<i>AT5G20890</i>	T-complex protein 1 subunit beta (CCT2)	<i>Q940P8</i>	57,28	Cytosol	(K)VqDDEVGDGTTSVVVLAGELLR(E) (K)ILSQDKEHFAEMAVDAVFR(L) (R)ALVAIPTTIADNAGLDSAELVAQLR(A) (R)GVEDLADAVK(V)	1 137,08 736,03 1 261,69 508,76	2 2 2 2	16
<i>AT2G33210</i>	Heat shock protein 60-2 (HSP60-2)	<i>F4IVR2</i>	61,47	Mitochondria	(R)NVIIIQSWGAPK(V) (K)TPVYTIASNAGVEGAVVVGK(L)	671,36 966,53	2 2	22
<i>AT3G16420</i>	PYK10-binding protein 1 (PBPI)	<i>O04314</i>	32,15	Cytosol	(K)TSDVIGSDEGTHFTLQVK(D) (K)SPEEVITGEHEHGK(S) (K)QTSPPFGLEAGTVFELK(E)	967,47 649,79 910,97	2 2 2	19

Tableau 2.3 Exemples des protéines carbonylées sélectionnées dans les échantillons de plantes témoins (Suite)

Gene reference number	Protein name	Accession number	Molecular mass (kDa)	Localisation	Peptide sequence	m/z	Charge	% coverage
<b>C. Cellular response to oxidative stress</b>								
<i>AT1G08830</i>	Superoxide dismutase 1 (SOD1)	P24704	15,09	Cytosol	(R)HAGDLGNITVGDDGTATFTTIDcQIPL (R)TGPNsIVGR(A) (R)AVVVAHDPPDDLGK(G) (K)GGHELSLATGNAGGR(V)	1 228,60 445,9017 466,2355	3 3 3	42
<i>AT2G28190</i>	Superoxide dismutase 2 (SOD2)	Q8L7R2	22,24	Plastid	(K)GTSDEGVVILTQDDSGPTTVNVR(I) (K)GGHELSLITGNAGGR(L) (M)APIAVGDDVVPDGTISFFDENDQLQTA SVHSLAAAGK(K) (K)VILFGVPGAFPTPcSMK(H)	1 224,09 713,85 1 190,59	2 2 3	18
<i>AT1G65980</i>	Peroxiredoxin-2B (PRXIIb)	Q9XEX2	17,42	Cytosol	(K)QHVPFGIEK(A) (K)FVADGSQEYTHLLGLELDLK(D) (R)RFALLLDDLK(V) (R)FALLLDDLK(V) (K)VTVAaVESGGFETVSSADDILK(A)	463,75 726,37 602,35 524,30 1 120,06	2 3 2 2 2	69
<i>AT4G11600</i>	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 6 (GPX6)	Q48646	25,58	Mitochondrion	(K)GNDDVDSLsIYK(G) (K)GGLFGDGIK(W) (K)FLVDKDGDNVVDR(F) (R)FAPITTSPLSIEK(D)	562,2851 432,2348 688,8629 645,8514	2 2 2 2	19
<i>AT4G25130</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase A4 (MSR4)	P54150	28,64	Plastid	(K)EcSFESLLDVFWNR(H) (R)IVTEILPAIK(F)	901,41 542,83	2 2	14
<i>AT5G63980</i>	SAL1 phosphatase (SAL1)	Q42546	37,56	Plastid	(K)ALLQSDVQSK(S) (K)SPVTADYGSQAVVSLVLEK(E) (K)ELSSEPFSLVAEEDSGDLR(K) (K)LVnDTLATEESFNGSTLSTDDLLR(A) (R)AIDcGTSEGGPNGR(H) (R)GDQYAVALGLLEEGK(V) (K)VVLGVLAcPNLPLASIAGNNK(N)	544,80 688,04 1 040,49 1 306,64 695,80 781,90 1 060,59	2 3 2 2 2 2 2	35
<i>AT4G29810</i>	MAP kinase kinase 2 (MKK2)	B3H757	37,26	Cytosol	(K)VIQLNIDEAIR(K) (K)AIPDSYLSAIFR(Q) (K)SDIWSLGLVVLEcATGK(F)	642,36 676,86 924,48	2 2 2	12
<i>AT2G43790</i>	Mitogen-activated protein kinase 6 (MPK6)	Q39026	40,05	Cytosol	(R)DIIPPPLR(N) (R)NAFPNDVYIAYELMDTDLHQIIR(S) (R)DLKPSNLILLNANcDLK(I) (R)VTSESDFMTEYYVVTR(W)	460,78 885,43 914,48 882,41	2 3 2 2	15
<i>AT1G54100</i>	Aldehyde dehydrogenase family 7 member B4 (ALDH7B4)	Q9SYG7	54,2	Cytosol	(R)LLSLEMGK(I) (R)IPLVSFTGSSR(V) (R)SVLFAAVGTAGQR(C)	445,75 582,32 638,85	2 2 2	7
<i>AT3G55040</i>	Glutathione S-transferase L2 (GSTL2)	Q9M2W2	33,05	Plastid	(K)IELVPIDLK(N) (K)VPALEHNNR(V) (K)QVVADELLSYTDsFSK(A)	520,32 350,52 901,44	2 3 2	12

**Tableau 4.4 Exemples des protéines carbonylées sélectionnées dans les échantillons de plantes traitées à l'ABA**

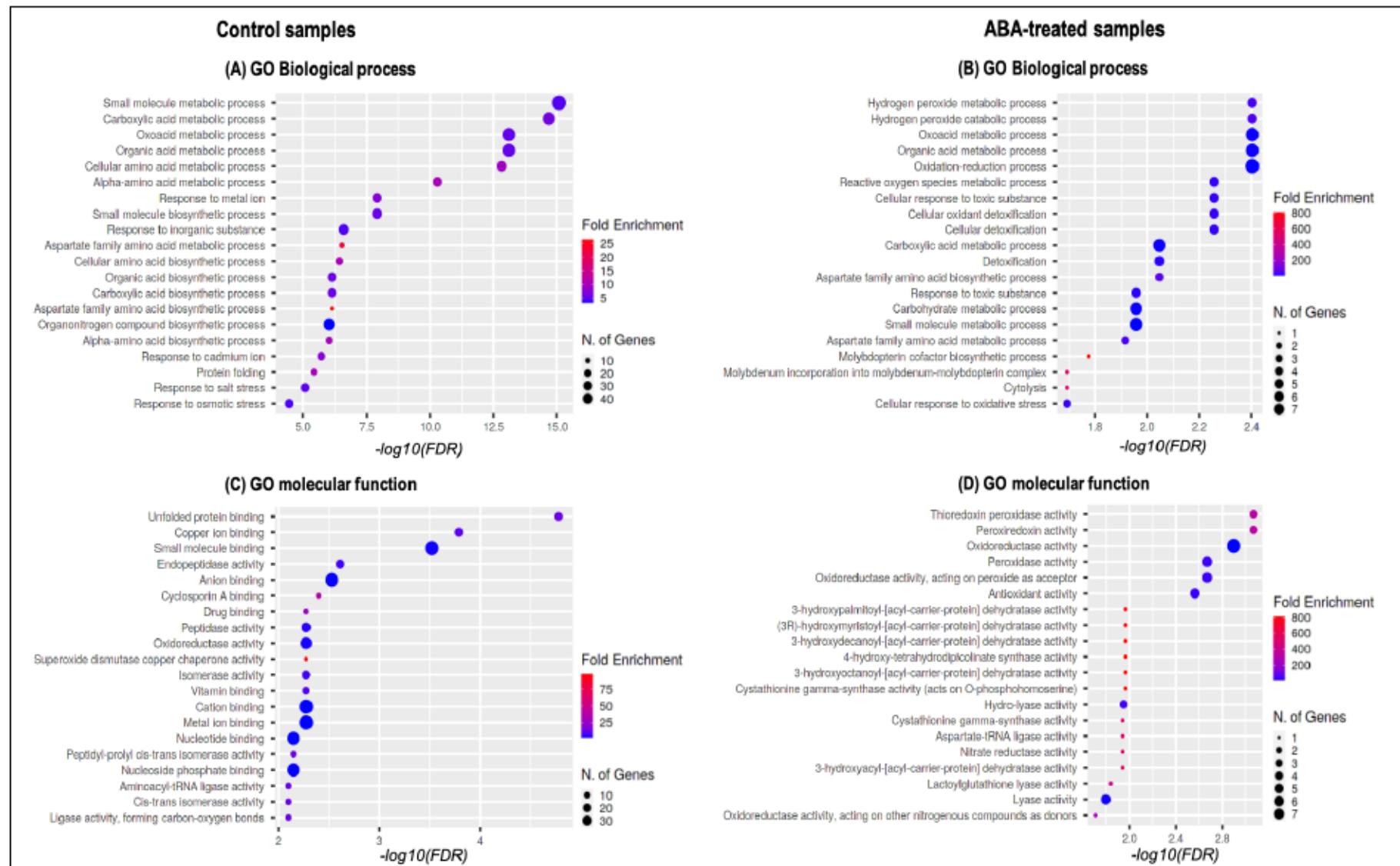
Gene reference number	Protein name	Accession number	Molecular mass (kDa)	Localisation	Peptide sequence	m/z	Charge	% coverage
<b>A. Aspartate family amino acid biosynthetic process</b>								
AT3G01120	Cystathionine gamma-synthase 1 (MTO1)	P55217	59,51	Plastid	(K)SVDEEVVVAEEGIR(E) (K)IGSVQLTDSK(H) (R)GIVTDAITTPVVNTSAYFFK(K) (R)YGNPTTVVLEDK(I) (K)VSLFFTESPTNPFLR(C) (R)GTLVcIDGTATPLNQK(A) (K)ALALGADLVVHSATK(Y) (R)VQQQNINSTAFR(M) (K)ADILQALEAI(-)	765,89 524,29 1 072,56 668,34 877,96 917,97 733,42 589,80 528,80	2 2 2 2 2 2 2 2 2	22
AT3G60880	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase 1 (DHPS)	Q9LZX6	40,62	Plastid	(K)TPYLPDGR(F) (R)DVQVLDLDDDFILIGR(-)	459,7377 866,942	2 2	12
AT4G33760	Aspartate-tRNA ligase (OKII)	F4JUT9	74,51	Plastid	(K)TGFVEVVAEHHVEILNPVR(T) (K)DVSNVFTESSFR(V)	670,03 694,33	3 2	5
<b>B. Reactive oxygen species metabolic process</b>								
AT1G60740	Peroxiredoxin-2D (PRXIID)	O22711	17,47	Cytosol	(K)FVADGSGEYTHLLGLELDLK(D) (R)FALLLDnLK(V) (R)KSGGLGDLNYPLVSDITK(S) (K)SGGLGDLNYPLVSDITK(S) (K)SPGVLIIPDQGIALR(G) (R)GLFIIDKEGVVIQHSTINNLGIGR(S) (R)TLQALQYVQENPDEVcPAGWKPGK(S) )	726,3776 524,3079 939,01 874,96 743,43 832,13 953,13	3 2 2 2 2 3 3	17
AT5G06290	2-Cys peroxiredoxin BAS1-like 2-(Cys Prx B)	Q9C5R8	29,78	Plastid	(R)AENEGLSDGLSLIEEVK(K) (R)AENEGLSDGLSLIEEVKK(E) (K)GGPISYADIIQLAGQSAVK(F) (K)FTYLASAIR(K) (K)GNLLITYTAYGSAGQWGLFDR(N) (K)FIAVGLGP(R) (K)LScLGQQInFEAYTYPVER(I)	901,95 644,34 944,51 521,29 1 045,01 465,28 1 145,05	2 3 2 2 2 2 2	48
AT4G09010	Ascorbate peroxidase 4 (APX4)	A0A1P8BSW6	31,04	Plastid	(K)FEADLLSDAISR(A) (R)LIELGLVFTAVEDAVK(E)	782,90 858,99	2 2	9
<b>C. Oxidoreductase activity</b>								
AT5G15910	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	Q9ZVQ2	34,84	Mitochondrion	(K)ATLFSLLLEDIPVTVR(S) (R)FPIADPNLAPR(L) (K)ELGATEAEEVLTAGGGAK(N) (K)VPASEFVSSINTIVVVIR(Q) (R)DITFQNTAGPEK(H) (R)SDSDLSVFFR(C)	837,48 605,83 851,93 965,55 660,83 586,78	2 2 2 2 2 2	12
<b>D. Carbohydrate metabolic process</b>								
AT2G21370	D-ribulose kinase (XK-1)	Q8L794	52,46	Plastid	(K)VPASEFVSSINTIVVVIR(Q) (R)DITFQNTAGPEK(H) (R)SDSDLSVFFR(C)	965,55 660,83 586,78	2 2 2	8
AT4G33220	Pectinesterase inhibitor 44 (PME44)	Q9SMY7	58,50	Extracellular	(K)GGGSVIAFVK(D) (K)DPDGTYTFELIQR(G) (R)KIERPEYK(Y) (K)IVNQELCGK(I) (R)EAGPLPLG GTK(I) (K)IVSFLDPDGWK(I)	467,77 727,35 531,80 479,27 520,29 638,83	2 2 2 2 2 2	11
<b>E. Organic metabolic process</b>								
AT1G76790	Indole glucosinolate O-methyltransferase 5 (IGMT5)	Q9SRD4	40,22	Cytosol	(R)DDVTGSSSFLTPSEIAIR(L) (R)TGFSVAVLK(K)	947,97 461,27	2 2	22
AT1G11840	Lactoylglutathione lyase (GLX1)	O65398	31,92	Peroxisome	(R)KIERPEYK(Y) (K)IVNQELCGK(I) (R)EAGPLPLG GTK(I) (K)IVSFLDPDGWK(I)	531,80 479,27 520,29 638,83	2 2 2 2	

Pour mieux comprendre les processus biologiques affectés par la carbonylation des protéines en réponse à l'ABA, un enrichissement de l'ontologie génétique (GO) a été effectué pour les deux listes d'échantillons carbonylés en utilisant ShinyGO, une ressource bio-informatique basée sur le Web [216]. Cette analyse a porté uniquement sur les

protéines carbonylées identifiées dans trois réplicas biologiques (Tableaux S.1 à S.5). Diverses catégories fonctionnelles étaient surreprésentées dans les échantillons témoins ainsi les échantillons traités à l'ABA (Figure 5).

De nombreuses protéines carbonylées identifiées dans les échantillons de contrôle étaient impliquées dans le processus métabolique des acides organiques au niveau cellulaire (GO:0006082), le processus de biosynthèse et de métabolisme des acides aminés (GO:0008652), le processus métabolique des petites molécules (GO:004428), le processus métabolique des oxoacides (GO:0043436), la réponse au stress oxydatif (GO:0006979), le stress salin (GO:0009651) et le repliement des protéines (GO:0006457) (Figure 4.7.A). En revanche, la liste des protéines carbonylées identifiées uniquement dans les échantillons traités à l'acide abscissique était enrichie en protéines impliquées dans le processus catabolique du peroxyde d'hydrogène (GO:0042744), l'homéostasie redox cellulaire (GO:0045454), le processus de biosynthèse des acides aminés de la famille de l'aspartate (GO:0009067), le processus métabolique des acides organiques (GO:0006082) et le processus métabolique des glucides (GO:0005975) (Figure 4.7.B).

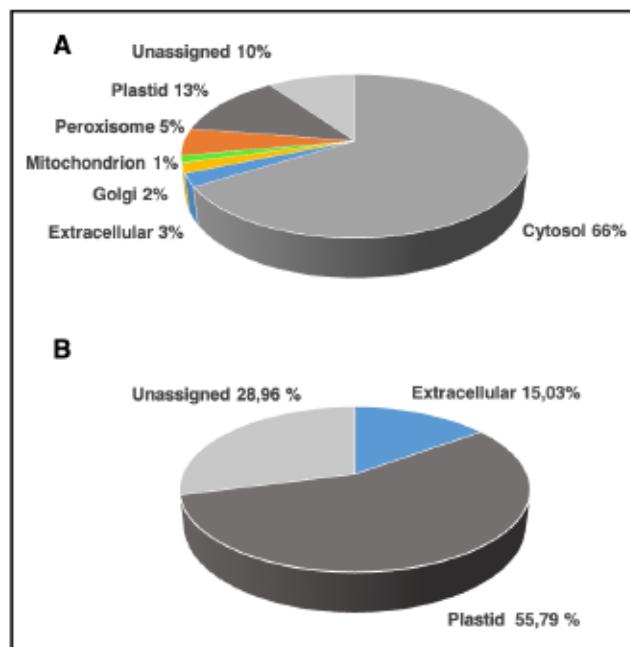
Les protéines carbonylées détectées dans les échantillons de contrôle se sont révélées avoir une activité de liaison aux ions cuivre, une activité de ligase, générant des liaisons carbone-oxygène, une activité de chaperon de cuivre superoxyde dismutase et une activité d'oxydoréductase, (figure 4.7.C). Les activités enzymatiques associées aux protéines carbonylées dans les plantes traitées à l'ABA comprenaient une activité oxydoréductase, une activité peroxiredoxine, une activité peroxydase et une activité lyase carbone-oxygène (Figure 4.7.D).



**Figure 4.7** Analyse d'enrichissement de l'ontologie génétique :

Les graphiques présentent les 20 principaux termes de l'ontologie génique (GO) représentés par les protéines carbonylées identifiées dans les échantillons de contrôle et les échantillons traités à l'ABA à l'aide de la ressource bio-informatique en ligne ShinyGo. Les protéines ont été regroupées en deux grandes catégories fonctionnelles : processus biologique (A) et fonction moléculaire (B). L'axe des X indique la valeur de  $-\log_{10}$  (valeur de p ajustée ou FDR). L'axe des Y indique les termes GO ( $P < 0,05$ ).

La localisation subcellulaire des protéines carbonylées dans les deux listes a été prédite en utilisant la base de données protéomique subcellulaire SUBA (<http://suba.plantenergy.uwa.edu.au>) [217] (Figure 4.8). Les protéines carbonylées détectées dans les échantillons de contrôle étaient réparties dans presque tous les organites, avec une proportion significative dans le cytosol (60 %). Seulement 13 % d'entre elles ont été attribuées aux chloroplastes. En revanche, les protéines carbonylées identifiées dans les échantillons traités à l'ABA étaient significativement enrichies dans les plastes (près de 56 %). La carbonylation des protéines cytosoliques était marginale dans ce groupe. Ces observations indiquent un changement dans le protéome carbonylé en réponse à l'ABA.



**Figure 4.8** Localisation subcellulaire prédite des protéines carbonylées dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* dans les échantillons témoins : (A) et les échantillons traités à l'ABA (B) en utilisant la base de données protéomiques subcellulaires SUBA.

## CHAPITRE V

### DISCUSSION

La carbonylation des protéines était considérée comme le marqueur le plus couramment utilisé de l'oxydation des protéines. Néanmoins, cette modification peut être impliquée dans les processus de transduction du signal chez les cellules animales et bactériennes. Pour les plantes, les études du rôle potentiel de la carbonylation des protéines dans la signalisation sont très limitées. Dans le cadre de cette étude, nous avons émis l'hypothèse que la carbonylation des protéines pourrait servir aussi dans la signalisation chez les plantes et plus spécifiquement dans le réseau de la signalisation de l'acide abscissique. Pour ce faire, nous avons examiné l'effet de l'acide abscissique sur la carbonylation des protéines et avons identifié les processus physiologiques associés au protéome carbonylé en réponse à l'ABA.

#### 1 Le choix de la méthode de marquage des protéines carbonylées

Les protéines carbonylées étant le marqueur le plus couramment utilisés de l'oxydation des protéines, diverses méthodes de détection et de quantification des protéines carbonylées ont été utilisées [147, 218].

Les protéines carbonylées ne peuvent pas être détectées directement, car ils n'ont pas de caractéristiques distinctives d'absorbance/fluorescence spectrophotométrique UV ou visible. Par conséquent, l'utilisation des sondes chimiques est nécessaire pour leur détection et leur quantification. La plus connue et la plus utilisée est la DNPH. Les protéines carbonylées sont préalablement dérivées avec de la 2-4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) qui se lie de manière covalente aux groupes carbonyles (par l'intermédiaire d'une base de Schiff) pour créer des adduits de protéines 2-4-dinitrophénylhydrazone (DNP) pouvant être détectés par approches protéomiques [219].

En outre, le marquage des protéines avec des colorants fluorescents a été largement utilisé dans les études protéomiques, comme dans le cas de la protéomique d'expression utilisant l'électrophorèse sur gel par différence de fluorescence (DIGE) [220]. La 2D-DIGE est une méthode protéomique qui se distingue en permettant la comparaison directe de protéines

provenant de (au moins) deux groupes d'échantillons indépendants. Deux sondes d'hydrazide fluorescentes à résolution spectrale qui se fixent sélectivement aux groupes carbonyles des protéines sont utilisées pour marquer les carbonyles des protéines provenant de tout échantillon biologique. Les sondes fluorescentes appariées ont les mêmes propriétés ioniques et de pH, mais ils absorbent et/ou émettent de la lumière à des longueurs d'onde différentes. La détection des protéines carbonylées avec des sondes fluorescentes a été utilisée dans les techniques d'analyses de la 2D-DIGE. Dans notre laboratoire, nous avons optimisé la détection de la carbonylation des protéines à l'aide des sondes fluorescentes dans l'électrophorèse sur gel à une seule dimension (1D-PAGE).

L'utilisation de sondes fluorescentes sensibles apporte une détection de protéines carbonylées de plus faible abondance ainsi une amélioration significative en termes de reproductibilité par comparaison à la méthode utilisant la 2-4-dinitrophénylhydrazine (DNPH).

## **2 Signification des protéines carbonylées dans les plantes témoins**

La carbonylation des protéines est un type d'oxydation des protéines qui a attiré l'attention de plusieurs chercheurs, car elle est irréversible et peut entraîner une perte de fonction des protéines ciblées. Cependant, la carbonylation des protéines peut également servir de médiateur aux processus de signalisation redox dans les plantes. Jusqu'à présent, peu de progrès ont été réalisés dans ce domaine.

Des protéines carbonylées ont été découvertes à tous les stades du cycle de vie des plantes, mais la fonction de la carbonylation des protéines pendant la croissance et le développement des plantes reste inconnue [180, 221]. L'application exogène d'aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés a induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la croissance et la défense des plantes [85, 222, 223] ce qui implique que la plante utiliserait la carbonylation des protéines par ces aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés pour transmettre des signaux hormonaux ou des ROS.

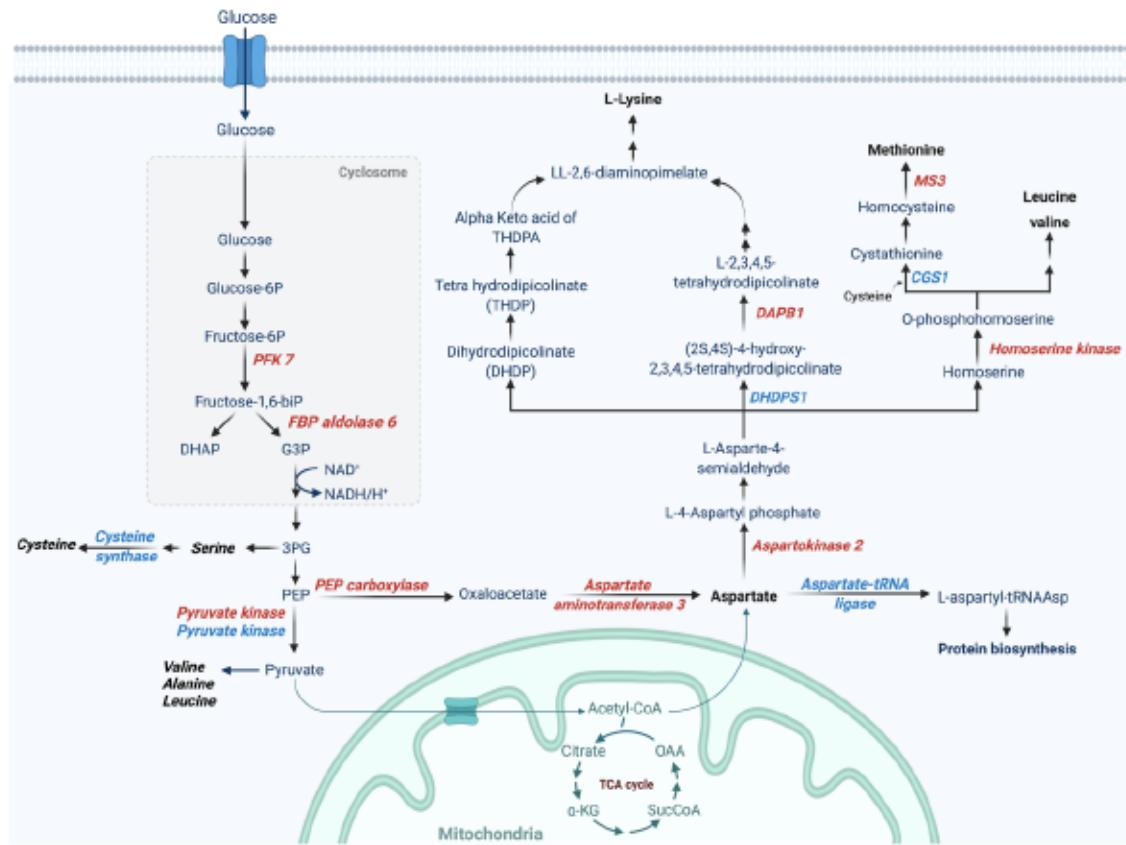
Dans cette étude, nous avons établi le profil des protéines carbonylées en réponse au traitement à l'acide abscissique des plantes d'*Arabidopsis thaliana*. En l'absence de stress ou de traitement à l'ABA, nos résultats ont démontré un niveau significatif de protéines carbonylées dans les plantes témoins de type sauvage (WT). Une observation similaire a été faite avec le double mutant *RbohD/F*, qui présentait autant de protéines carbonylées que le WT. Ces données suggèrent que la carbonylation des protéines n'est pas toujours liée au stress, mais qu'elle peut avoir un rôle physiologique dans la croissance et le développement des plantes. Il a été démontré, par exemple, que la carbonylation des protéines facilite la mobilisation des protéines de stockage des semences pendant l'imbibition et la germination des graines [170, 181, 182, 224-226]. De plus, nos résultats suggèrent qu'en absence de stress, les protéines *RbohD* et *RbohF* pourraient ne pas être impliquées dans la création des ROS nécessaires à la carbonylation des protéines.

À partir de nos résultats, on pense qu'en absence du stress, les ROS à faible quantité peuvent avoir un effet de protection des protéines, alors que des niveaux élevés de stress oxydatif augmentent probablement le degré de modification oxydative post-traductionnelle des enzymes antioxydantes. En effet, plusieurs protéines carbonylées trouvées dans nos échantillons non-traités à l'ABA sont des enzymes impliquées dans la détoxicification des ROS tels que la superoxyde dismutase 1 et la superoxyde dismutase 2 avec un pourcentage de couverture de 42 % et 18 % respectivement. La glutathion peroxydase (GPx) était également carbonylée dans les échantillons de contrôle. Des études menées sur des cellules de mammifères ont montré qu'un état d'hyperglycémie modeste dans les cellules endothéliales prédiabétiques semble activer les systèmes de défense antioxydants en augmentant l'activité de la glutathion peroxydase-1 via une carbonylation catalysée par un métal, renforçant ainsi la réaction enzymatique [227]. L'accumulation de la carbonylation peut entraîner donc la désactivation ou la dégradation des enzymes antioxydantes bénéfiques après une période initiale d'activité élevée.

Plusieurs protéines carbonylées issues de l'échantillon du contrôle sont impliquées aussi dans les voies glycolytiques et de biosynthèse des acides aminés, comme indiqué dans le tableau 4.2, tableau 4.3 et la figure 4.7. La carbonylation des protéines, contrairement à

l'ubiquitination des protéines, qui cible les protéines pour les dégrader, ne nécessite pas d'ATP et n'est pas enzymatique. Par conséquent, La carbonylation de ces protéines pourrait être un moyen pour la cellule de réduire le coût énergétique du contrôle du flux métabolique par ces voies. Ainsi, la carbonylation des enzymes pourrait être une technique rapide et économique en énergie pour moduler la disponibilité des enzymes dans le métabolisme des plantes dans les conditions physiologiques non stressantes.

En outre, nos résultats, révèlent que la carbonylation des protéines pourrait réguler l'activité des enzymes essentielles de la famille des acides aminés de l'aspartate (Figure 5.1).



**Figure 5.1** Un aperçu des enzymes carbonylées de la voie de biosynthèse des acides aminés dérivés de l'aspartate : Les couleurs rouge et bleue indiquent les protéines carbonylées identifiées dans les échantillons de contrôle et dans les échantillons traités à l'ABA, respectivement. Glucose-6P : glucose-6-Phosphate ; Fructose -6P : fructose-6-Phosphate PFK7 : 6-phosphofructokinase ATP-dépendante ; Fructose-1,6-Bi : fructose-1,6-Biphosphate ; FBP aldolase 6 : fructose-bisphosphate aldolase ; DHAP : Dihydroxyacétone phosphate ; G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate ; PEP : phosphoénolpyruvate ; PEP carboxylase : phosphoénolpyruvate carboxylase ; DHDPS1 : 4-hydroxy-tétrahydrodipicolinate synthase 1 ; DAPB1 : probable 4-hydroxy-tétrahydrodipicolinate réductase 1 ; CGS1 : cystathionine gamma-synthase 1 ; MS3 : méthionine synthase 3 ;  $\alpha$ -KG : alpha Kétonglutarate ; SuccCoA : succinyl-coenzyme A ; OAA : oxaloacétate

Plutôt que d'arrêter complètement la voie métabolique, la carbonylation de ces enzymes est plus susceptible de réduire leur abondance ou de les rendre résistantes à d'autres méthodes de régulation post-traductionnelle. Cette hypothèse mérite d'être approfondie. Les enzymes de l'aspartate kinase, la dihydrodipicolinate synthase, l'homosérine déshydrogénase, la cystathionine-synthase, la thréonine synthase et la thréonine

désaminase contrôlent la production des acides aminés de la famille de l'aspartate : Lysine, Méthionine, Threonine, Isoleucine [228]. La cystéine est un substrat de la cystathionine-synthase dans la production de L-Méthionine, en plus d'être vitale pour la biosynthèse du glutathion. Il a été démontré que la L-Méthionine influence la croissance et le mouvement des stomates en activant les canaux  $Ca^{2+}$  des homologues des récepteurs du glutamate GLR3.1 et GLR3.5 d'*Arabidopsis* [229]. Les canaux  $Ca^{2+}$  GLR3.1/3.5 sont distincts des canaux  $Ca^{2+}$  activés par les ROS et jouent un rôle dans le maintien des niveaux basaux de  $Ca^{2+}$  cytosolique [229]. La méthionine est également le précurseur direct de la S-adénosyl-méthionine, le principal donneur de groupes méthyles dans les processus de transméthylation, la production de polyamines et d'éthylène, et la méthylation des résidus cytosine dans l'ADN [228, 230]. La S-adénosylméthionine est un activateur allostérique de la thréonine synthase et un effecteur de l'autorégulation posttranscriptionnelle du gène de la cystathionine synthase [230, 231]. La S-adénosyl-homocystéine est produite par la méthylation à base de S-adénosyl-méthionine et est recyclée en méthionine via l'activité séquentielle de l'adénosyl homocystéinase et de la méthionine synthase [228]. Par conséquent, la régulation des gènes dépend de l'homéostasie des cystéines, méthionine et autres acides aminés dérivés de l'Aspartate. Ainsi, la carbonylation des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés de la famille de l'aspartate pourrait influencer l'homéostasie de ces acides aminés et la régulation des gènes.

### **3 L'ABA modifie le schéma de carbonylation des protéines dans les feuilles**

D'après nos analyses protéomiques sur gel et par spectrométrie de masse, L'ABA a créé un changement dans le schéma de carbonylation des protéines dans les plantes. Ce changement n'est pas lié aux niveaux souvent accrus de protéines carbonylées dans les plantes exposées à un stress létal. Étant donné que l'ABA et le stress oxydatif sévère sont tous deux induits en réponse à un stress sévère, l'effet de l'ABA sur la carbonylation des protéines peut être éclipsé par l'augmentation des protéines carbonylées induite par le stress oxydatif [232]. C'est pourquoi, dans cette étude, nous avons utilisé l'acide abscissique exogène pour examiner le protéome carbonylé. Nous espérions ainsi séparer l'effet réel de l'ABA sur la carbonylation des protéines de l'effet du stress oxydatif. Les

analyses sur gel ont révélé que l'ABA et le stress léger ont des effets similaires sur la carbonylation des protéines. Des conditions de stress léger ont été utilisées pour réduire les effets confondants du stress oxydatif lors de l'étude de l'effet du stress osmotique sur la croissance des plantes [233-236].

Les différents génotypes d'*A. thaliana* qui ont montré une survie accrue dans des conditions de stress sévère n'ont pas montré une croissance améliorée dans des conditions de stress plus léger, ce qui implique que les deux processus (stress modéré et stress sévère) sont contrôlés par des systèmes distincts [237]. La réduction des niveaux de protéines carbonylées après le traitement à l'ABA et le traitement au stress modéré pourrait être due à un déplacement du protéome carbonylé pendant le stress léger. Ceci est en accord avec le fait que sous un stress léger, les réponses générales au stress telles que la signalisation de l'ABA, du  $\text{Ca}^{2+}$  et des ROS se produisent simultanément [238, 239].

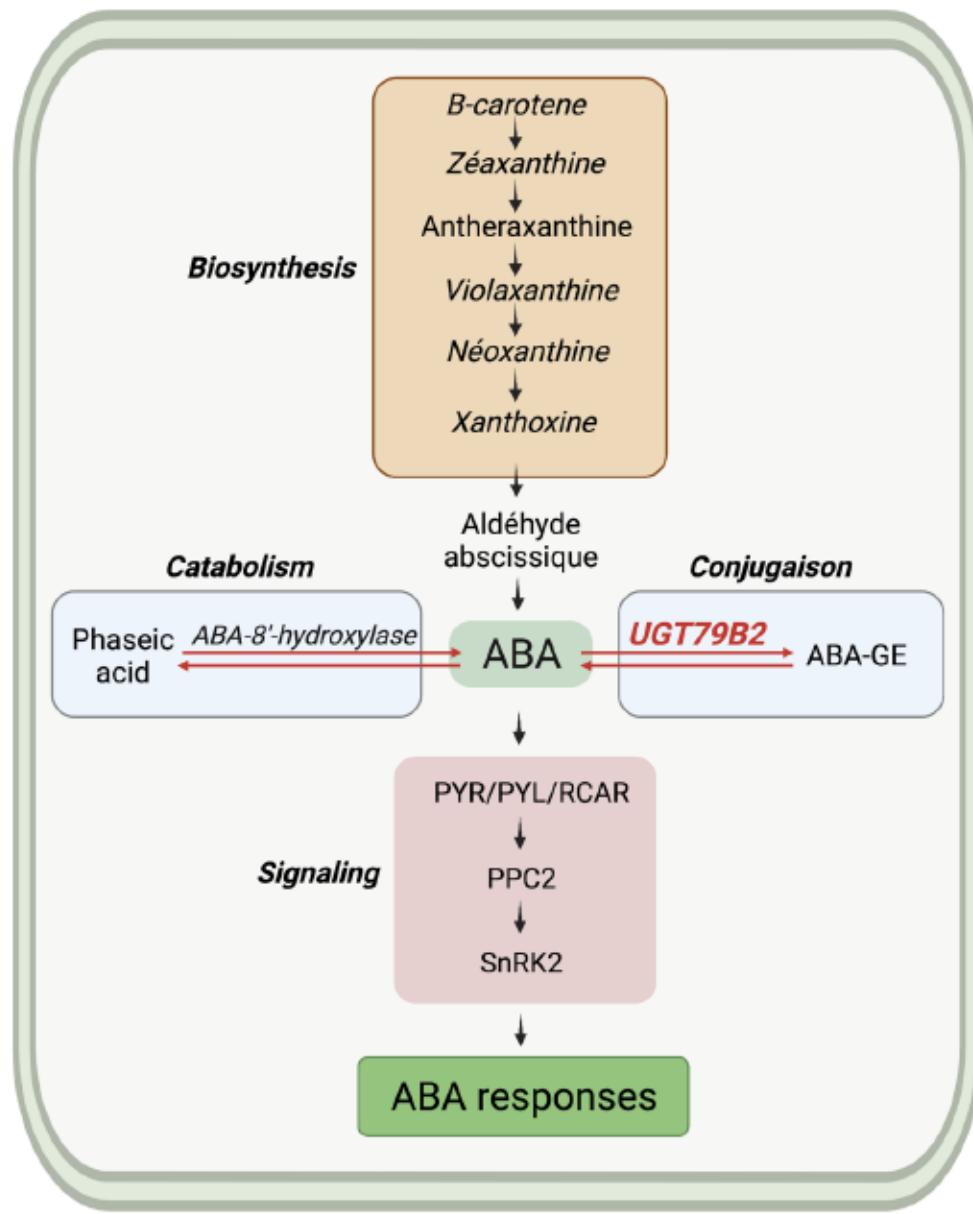
Selon nos résultats, plusieurs protéines ayant des fonctions régulatrices dans la réponse des plantes au stress ont été trouvées carbonylées dans les échantillons non traités, mais pas dans les échantillons traités à l'ABA. Ces protéines comprennent la phosphatase SAL1, la MAP kinase 6 et la protéine activée par l'action mitogène (MAP) kinase 2. Leur carbonylation dans des conditions de contrôle empêche probablement une activation futile en absence de stress. Lorsque le stress oxydatif se produit, les cellules fonctionnent pour s'opposer aux effets oxydants qui en résultent et pour rétablir l'équilibre redox. Tous les organismes ont des réponses adaptatives au stress oxydatif, les enzymes de défense antioxydantes étant induites par des changements dans les niveaux des ROS, l'activation des systèmes antioxydants cellulaires en réponse à un stress léger ou à l'ABA empêcherait la carbonylation de ces protéines carbonylées en absence du stress ce qui entraîne l'activation ou l'extinction des gènes codant pour les enzymes défensives.

Des protéines peroxiredoxines (Prxs) ont été trouvées dans les deux groupes d'échantillons. La protéine Peroxiredoxin-2B a été identifiée dans les protéines de contrôle. En outre, la peroxiredoxine 2-Cys (2-Cys Prx B) et la peroxiredoxine-2D (PRXIID) ont été trouvées dans les échantillons traités à l'ABA. Les protéines peroxiredoxines (Prxs) sont très sensibles à l'inactivation par oxydation et elles fonctionnent dans la défense antioxydante et le réseau de signalisation redox de la cellule.

Il a été démontré que  $H_2O_2$  module la signalisation cellulaire en oxydant Prdx1 [240]. D'autres études ont également montré que les activités des Prxs sont également contrôlées par la phosphorylation et l'acétylation. Cette phosphorylation inactive l'activité peroxydase résultant en une augmentation du niveau de  $H_2O_2$  intracellulaire. De plus, il a été montré que l'acétylation de Prx1 et Prx2 augmente l'activité peroxydase et la résistance à la suroxydation [241]. Une autre enzyme antioxydante clé qui est carbonylée après le traitement à l'ABA est l'ascorilate peroxydase (APX). Les isoformes de l'ascorilate peroxydase sont rapidement inactivées par le peroxyde d'hydrogène. La carbonylation de l'APX peut indiquer l'implication de la carbonylation dans la régulation de l'activité d'antioxydants végétaux spécifiques dans la voie de signalisation de l'ABA.

Lorsque les plantes sont exposées à des conditions défavorables, le niveau d'ABA augmente pour déclencher les réseaux de signalisation de l'ABA et initier des réponses au stress [48]. Les réponses médiées par l'ABA aux stress sont contrôlées par la concentration locale d'ABA qui est régulée par les événements d'hydrolyse et de conjugaison de l'ABA [48], [242], [243]. La principale forme de conjugaison de l'ABA est la glycosylation, qui produit l'abscisate de  $\beta$ -D-Glucopyranosyl (ABA-GE). Ce dernier est une forme de stockage et un produit final inactif du métabolisme de l'ABA [244], [245], [246].

La glycosylation de l'ABA est un processus réversible qui joue un rôle clé dans le maintien des niveaux d'ABA dans les tissus végétaux. Elle est catalysée par des glycosyltransférases (UGT). Ces dernières sont constituées de 56 familles impliquées dans la régulation des hormones végétales [247], [248], [249], [250]. Parmi elles, la famille de UDP-glycosyltransférase 79B2 a été trouvée carbonylée en réponse de l'ABA. Il serait intéressant d'étudier leurs fonctions dans la plante pour enrichir les connaissances sur les voies de signalisation impliquant l'ABA. En conclusion, nos résultats montrent que la carbonylation de l'UDP-glycosyltransférase 79B2 peut être impliquée dans la régulation de la glycosylation de l'ABA et ainsi dans la modulation de la réponse des plantes aux stress.



**Figure 5.2** Rôle potentiel de la glycosyltransférase UGT79B7 dans la régulation du niveau de l'ABA par le biais de la carbonylation chez *Arabidopsis thaliana* en réponse au stress.

## CHAPITRE VI

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours des deux dernières décennies, la biologie de l'oxydoréduction a suscité beaucoup d'intérêt dans les recherches scientifiques sur les stress environnementaux et les signaux hormonaux des plantes. Cependant, le mécanisme exact des réponses hormonales par le ciblage des espèces réactives de l'oxygène dans les événements de signalisation cellulaire n'a pas été complètement défini. Des études récentes, toutefois, suggèrent que l'oxydation irréversible des protéines pourrait être impliquée dans la transduction du signal [10] en modulant la fonction biologique des protéines [11], révélant la possibilité que la carbonylation des protéines pourrait jouer un rôle régulateur important dans le stress et les réponses hormonales des espèces d'oxygène réactif. Dans la présente étude, l'objectif principal de cette étude est d'identifier les protéines qui ont été exprimées de manière différentielle dans les échantillons d'*Arabidopsis thaliana* de type sauvage (WT) traités à l'ABA afin d'élucider le rôle de la carbonylation des protéines dans la voie de signalisation de l'ABA, fournissant ainsi des ressources importantes pour les études futures sur la signalisation régulée par la carbonylation chez les plantes.

Globalement, le schéma de carbonylation des protéines a été modifié par l'ABA dans les feuilles d'*A. thaliana*. Notre approche expérimentale nous a permis d'identifier les protéines modifiées indépendamment du type de mécanismes (oxydation catalysée par les métaux, addition de Michael de RCS sur les chaînes latérales de lysine, cystéine et Histidine). En effet, différents RCS sont produits dans la cellule, et leur composition chimique et les protéines qu'ils modifient devraient avoir des effets variés [251]. Par conséquent, il est difficile d'identifier le RCS responsable de l'altération *in vivo*, car pour le moment, la localisation et la nature du RCS médiant la modification peuvent varier. Pour ce faire, une approche combinée impliquant le dépistage de la réactivité en utilisant des substrats RCS arbitraires, suivie d'une caractérisation ciblée, ainsi que l'utilisation de la spectrométrie de mobilité ionique, peut être utile [252, 253]. Pour la signalisation, une protéine cible doit avoir une haute affinité avec le RCS et être capable de traduire le signal RCS dans une protéine en aval via d'autres modifications. Pour une protéine cible, la

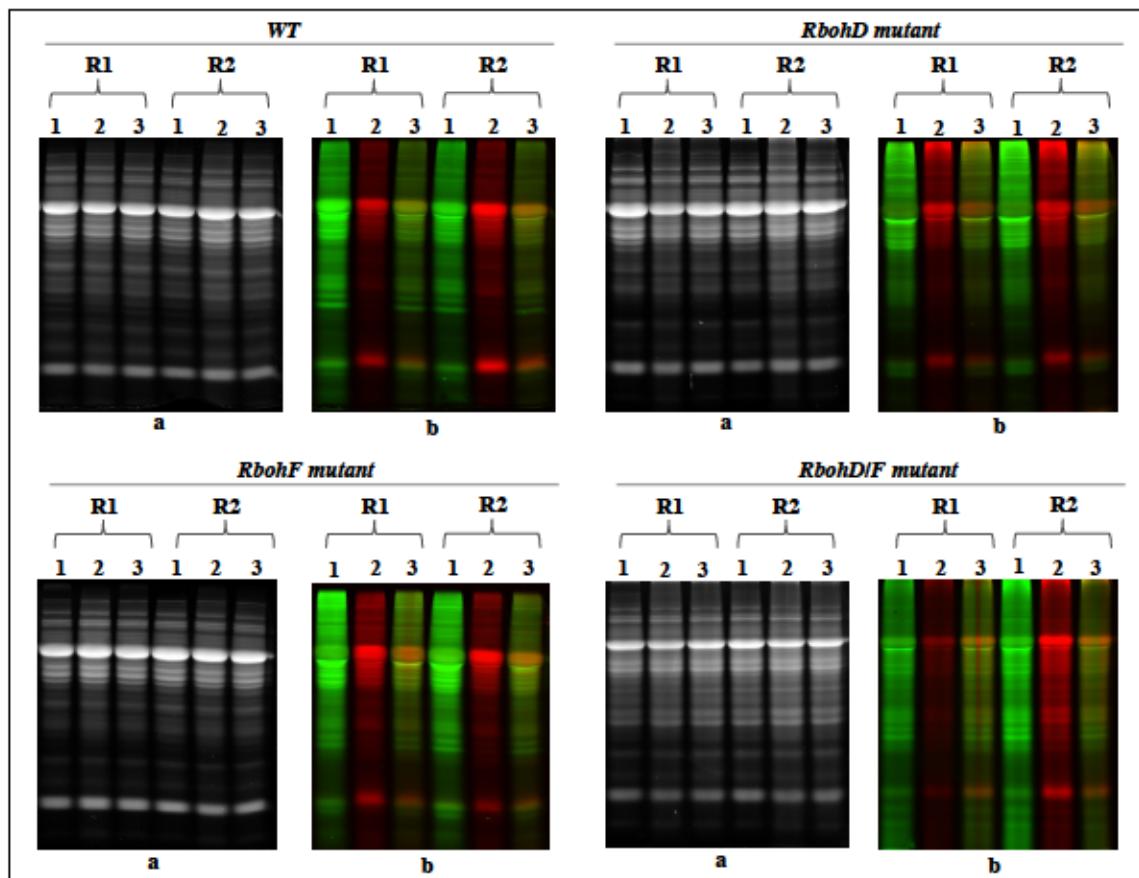
carbonylation d'une protéine impliquée dans les voies de signalisation des ROS ou des hormones est susceptible d'avoir un effet dominant même si seulement une petite fraction du pool de la protéine cible est carbonylée [254].

Les informations sur les résidus modifiés lors de la carbonylation n'ont pas pu être identifiées avec confiance. Cela est dû à l'approche d'enrichissement que nous avons utilisée [143, 215].

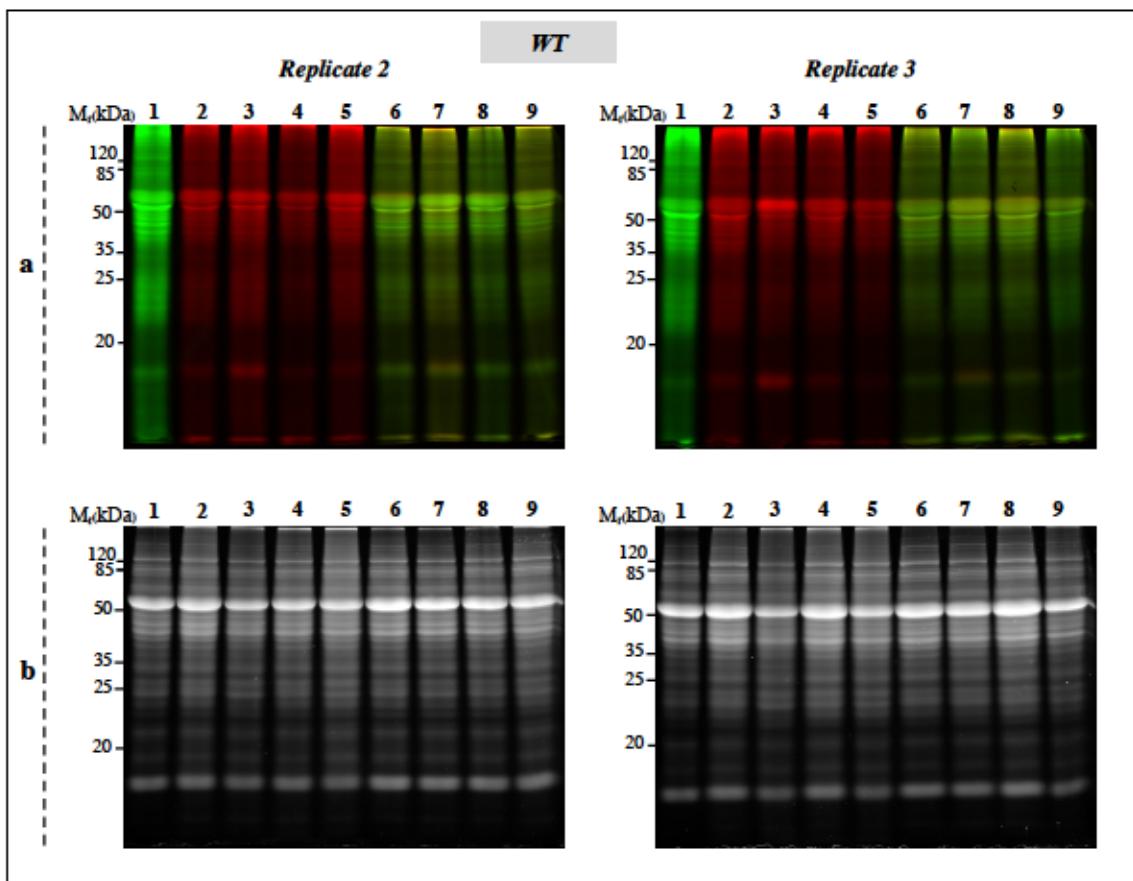
Cependant, l'identification des résidus modifiés dans une protéine carbonylée d'intérêt peut être obtenue avec une grande confiance en utilisant une approche protéomique descendante qui est une méthode capable d'identifier et de quantifier des protéoformes uniques grâce à l'analyse de protéines intactes [255]. Indépendamment de cette limitation, l'ABA peut donc influencer l'activité des enzymes et des protéines régulatrices de l'activité des enzymes liées au stress ainsi que des enzymes de la biosynthèse des acides aminés de la famille de l'aspartate lors de la carbonylation des protéines soit en favorisant ou en empêchant leur carbonylation.

Le mécanisme de cette modulation est inconnu à ce jour. Nos données pourraient être considérées comme preuve sur les rôles possibles de la carbonylation des protéines dans les processus de transduction du signal de l'ABA chez les plants et ces résultats fournissent les bases de futures recherches visant à déterminer la fonction de la carbonylation de ces protéines dans la signalisation de l'ABA, non seulement pour la modulation de la fonction stomatique, mais aussi pour d'autres processus régulés par l'ABA. Des études plus détaillées sont nécessaires dans lesquelles les sites de carbonylation sont identifiés pour comprendre comment la carbonylation affecte la protéine individuelle, sa conformation et sa fonction.

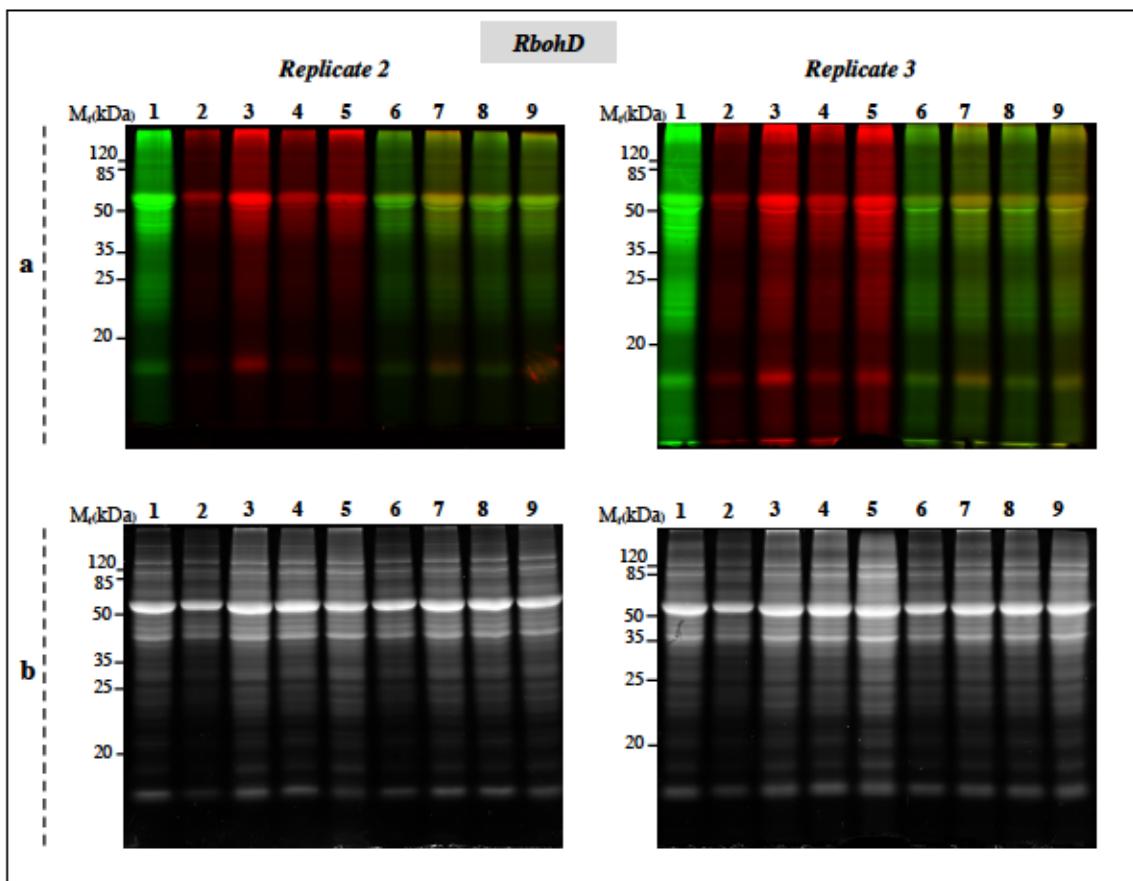
## ANNEXE



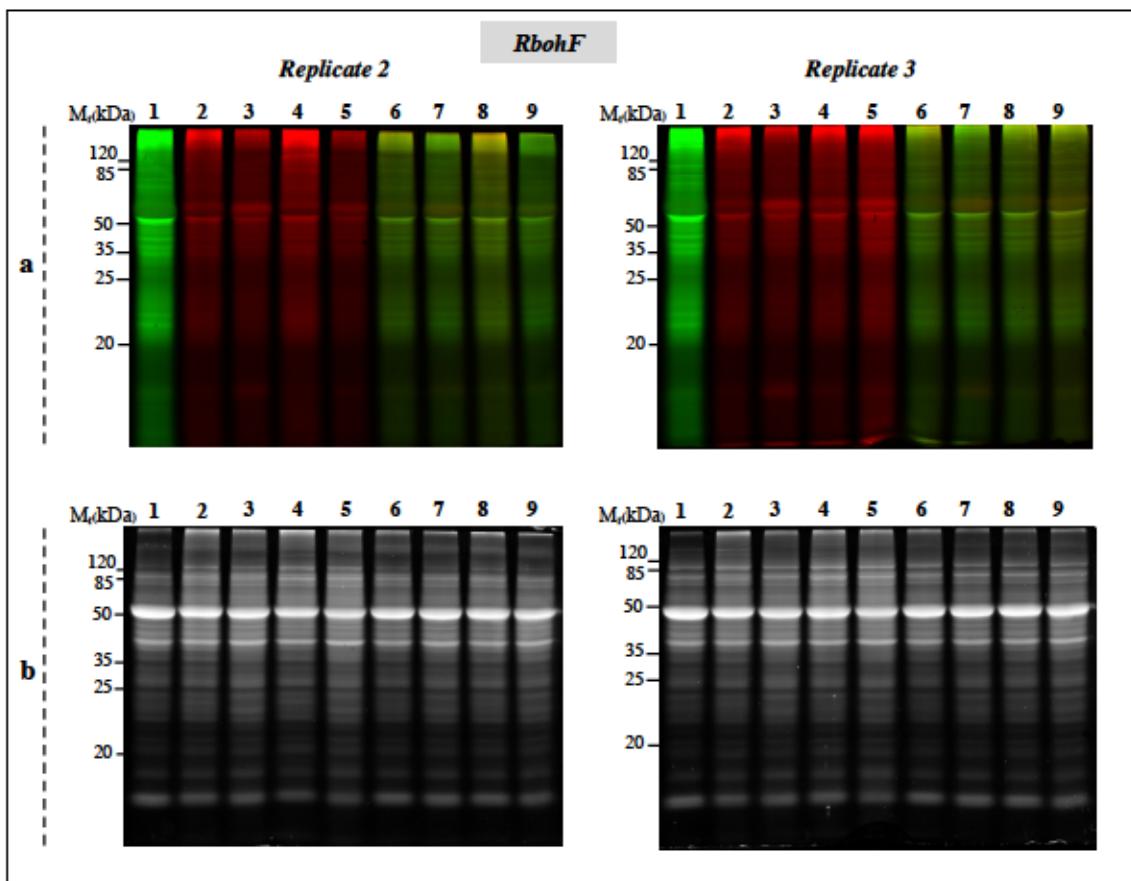
**Figure S.1** Analyse du protéome carbonylée induite par l'ABA par SDS-PAGE pour les réplicats 2 et 3: 10 µg de protéines provenant des plantes d'*Arabidopsis thaliana* de type sauvage (WT), âgés de 4 semaines et traitées avec ou sans 100 µM d'acide abscissique (ABA) pendant 2 heures, ont été dérivatisés avec des sondes fluorescentes et chargées dans chaque puits: Les protéines d'échantillons témoins ont été marquées avec Cy5,5 et les protéines d'échantillons traités avec l'ABA ont été marquées avec Cy7,5. (a) : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS (1D SDS-PAGE) des protéines totales marquées avec AzureRed, (b) : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS (1D SDS-PAGE) des protéines carbonylées. Puits 1 : des plantes témoins, puits 2 : des plantes traitées avec ABA, puits 3 : 5 µg de chaque échantillon ont été mélangés et chargés dans le puits.



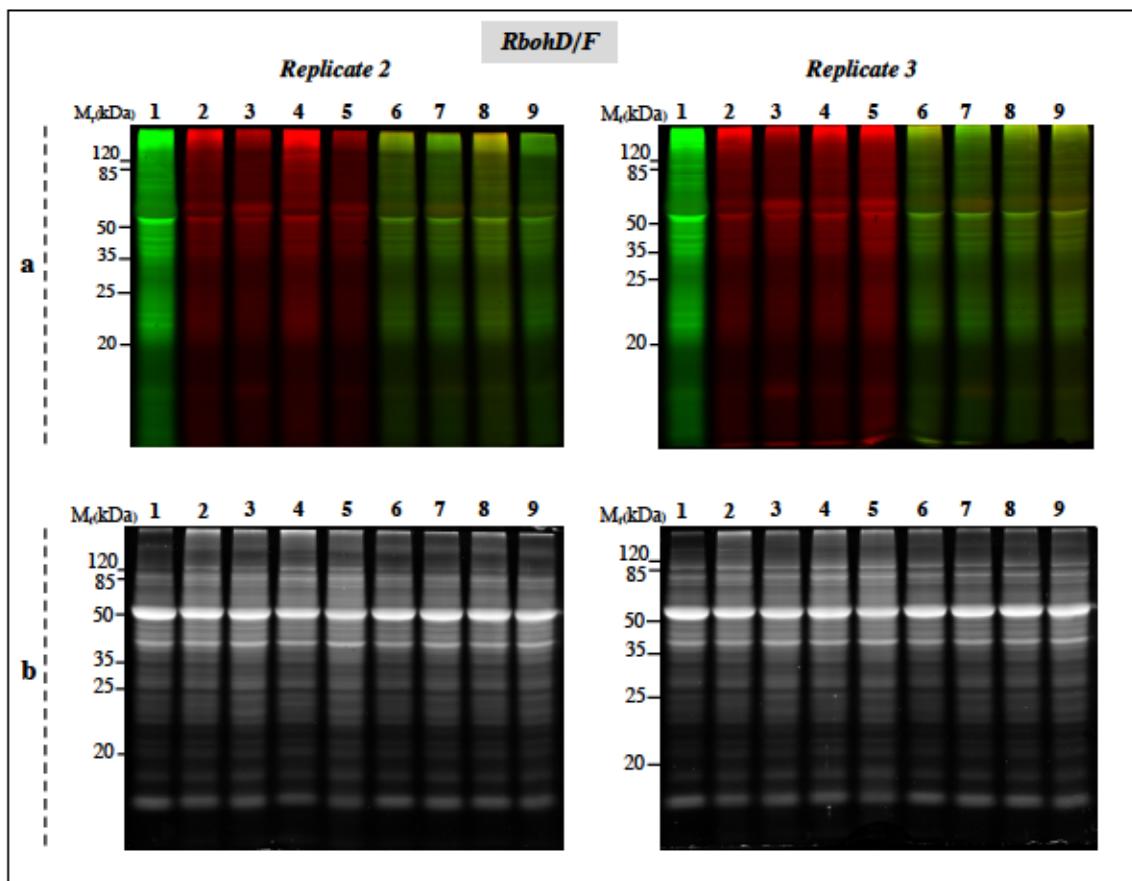
**Figure S.2** Effet des traitements de stress léger sur les semis d'*Arabidopsis thaliana* de type sauvage (WT) pour les réplicats 2 et 3 : 10 µg de protéines provenant des semis d'*Arabidopsis thaliana* de type sauvage (WT), âgés de 10 jours et cultivées sur un milieu de  $\frac{1}{2}$ x Murashige et Skoog ( $\frac{1}{2}$ x MS) avec ou sans traitements de stress pendant 10 jours, ont été chargées dans chaque puits : Les figures (a) montrent des gels représentant les protéines carbonylées marquées avec des hydrazides fluorescents: L'échantillon témoin a été marqué avec Cy5,5 et les échantillons de stress avec Cy7,5. Les gels (b) représentent les protéines totales marquées avec AzureRed. Puits 1, échantillons de contrôle ; puits 2-5, échantillons de plantules exposées respectivement à 25 mM de mannitol, 100 mM de mannitol, 50 mM de NaCl et 100 mM de NaCl ; puits 6-9, mélange de quantités égales (5 µg) d'échantillons de contrôle et chacun des traitements du stress, dans le même ordre que pour les voies 2 à 5.



**Figure S.3** Effet des traitements de stress léger sur les semis d'*Arabidopsis thaliana* du mutant *RbohD* pour les réplicats 2 et 3 : 10 µg de protéines provenant des semis d'*Arabidopsis thaliana*, âgés de 10 jours et cultivés sur un milieu de  $\frac{1}{2}$ x Murashige et Skoog ( $\frac{1}{2}$ x MS) avec ou sans traitements de stress pendant 10 jours, ont été chargées dans chaque puits : Les figures (a) montrent des gels représentant les protéines carbonylées marquées avec des hydrazides fluorescents : L'échantillon témoin a été marqué avec Cy5,5 et les échantillons de stress avec Cy7,5. Les gels (b) représentent les protéines totales marquées avec AzureRed. Puits 1, échantillons de contrôle ; puits 2-5, échantillons de plantules exposées respectivement à 25 mM de mannitol, 100 mM de mannitol, 50 mM de NaCl et 100 mM de NaCl ; puits 6-9, mélange de quantités égales (5 µg) d'échantillons de contrôle et chacun des traitements du stress, dans le même ordre que pour les voies 2 à 5.



**Figure S.4** Effet des traitements de stress léger sur les semis d'*Arabidopsis thaliana* du mutant *RbohF* pour les réplicats 2 et 3 : 10 µg de protéines provenant des semis d'*Arabidopsis thaliana*, âgés de 10 jours et cultivés sur un milieu de  $\frac{1}{2}$  de MS avec ou sans traitements de stress pendant 10 jours, ont été chargées dans chaque puits : Les figures (a) montrent des gels représentant les protéines carbonylées marquées avec des hydrazides fluorescents : L'échantillon témoin a été marqué avec Cy5,5 et les échantillons de stress avec Cy7,5. Les gels (b) représentent les protéines totales marquées avec AzureRed. Puits 1, échantillons de contrôle ; puits 2-5, échantillons de plantules exposées respectivement à 25 mM de mannitol, 100 mM de mannitol, 50 mM de NaCl et 100 mM de NaCl ; puits 6-9, mélange de quantités égales (5µg) d'échantillons de contrôle et chacun des traitements du stress, dans le même ordre que pour les voies 2 à 5.



**Figure S.5** Effet des traitements de stress léger sur les semis d'*Arabidopsis thaliana* du mutant *RbohD/F* pour les réplicats 2 et 3 : 10 µg de protéines provenant des semis d'*Arabidopsis thaliana*, âgés de 10 jours et cultivés sur un milieu de  $\frac{1}{2}$ x Murashige et Skoog ( $\frac{1}{2}$ x MS) avec ou sans traitements de stress pendant 10 jours, ont été chargées dans chaque puits : Les figures (a) montrent des gels représentant les protéines carbonylées marquées avec des hydrazides fluorescents: L'échantillon témoin a été marqué avec Cy5,5 et les échantillons de stress avec Cy7,5. Les gels (b) représentent les protéines totales marquées avec AzureRed. Puits 1, échantillons de contrôle ; puits 2-5, échantillons de plantules exposées respectivement à 25 mM de mannitol, 100 mM de mannitol, 50 mM de NaCl et 100 mM de NaCl ; puits 6-9, mélange de quantités égales (5µg) d'échantillons de contrôle et chacun des traitements du stress, dans le même ordre que pour les voies 2 à 5.

**Tableau S.1** Liste complète des protéines carbonylées identifiées dans trois réplicats biologiques des échantillons des plantes témoins.

<i>N</i>	<i>Protein ID</i>	<i>Protein name</i>
1	Q0WNZ5	5-methyltetrahydropteroylglutamate–homocysteine methyltransferase 3
2	Q9SJQ9	Fructose-bisphosphate aldolase 6
3	Q9M2T9	Methionine-tRNA ligase
4	B9DFR6	Cysteine synthase
5	Q6XJG8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog B
6	Q9FI53	Fumarate hydratase 2
7	F4IVR2	Heat shock protein 60-2
8	A0A1P8AUM8	3-isopropylmalate dehydrogenase
9	Q93W22	60S ribosomal protein L10-3
10	Q9FFP6	Pyruvate kinase
11	Q9SGA6	40S ribosomal protein S19-1
12	P42733	40S ribosomal protein S11-3
13	Q9LFX8	Glycine-rich protein
14	Q43348	Acid beta-fructofuranosidase 3
15	Q9MAH0	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1
16	Q42262	40S ribosomal protein S3a-2
17	O23717	Proteasome subunit beta type-5-A
18	P57720	Chorismate synthase
19	Q9XEX2	Peroxiredoxin-2B
20	Q9SUR0	AT4G23670 protein
21	Q9S6Z7	Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase D1
22	Q9C5C8	Peptide methionine sulfoxide reductase B2
23	Q9S9M7	Nuclear protein
24	Q8L7R2	Homoserine kinase
25	Q9ZU23	Jacalin-related lectin 5
26	Q9LVW7	Carbamoyl-phosphate synthase small chain
27	Q9SAK4	Succinate-semialdehyde dehydrogenase
28	Q9LZF5	Lectin-like protein
29	Q9C5J7	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 7
30	F4IHJ8	Ribosomal protein S25 family protein
31	Q01525	14-3-3-like protein GF14 omega
32	Q9ZVA2	EP1-like glycoprotein 2
33	Q42546	SAL1 phosphatase
34	Q38900	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-1
35	Q9XI22	F9L1.42 protein
36	Q93Z84	At2g04039/At2g04039
37	Q8VY70	Dimethylallyl, adenosine tRNA methylthiotransferase
38	Q76FS5	Solanoyl diphosphate synthase 2
39	O04314	PYK10-binding protein 1
40	Q9SF85	Adenosine kinase 1
41	Q9LQQ3	At1g07750/F24B9_13
42	Q42527	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase 2
43	Q9SR70	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP16-4
44	Q9SWG0	Isovaleryl-CoA dehydrogenase

**Tableau S.2** Liste complète des protéines carbonylées identifiées dans trois réplicats biologiques des échantillons des plantes témoins (Suite 1)

<i>N</i>	<i>Protein ID</i>	<i>Protein name</i>
46	Q8L7N0	Eukaryotic translation initiation factor 4A1
47	Q9SGW3	T-complex protein 1 subunit zeta 2
48	O80763	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 homolog A
49	Q9ZUF6	Probable nucleoredoxin 1
50	Q940P8	Subtilisin-like protease SBT1.8
51	Q8S904	T-complex protein 1 subunit beta
52	Q42406	Adrenodoxin-like protein 2
53	Q93VP3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP18-4
54	O22785	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2 1
55	Q9S9P1	Pre-mRNA-processing factor 19 homolog 2
56	Q9FHW7	40S ribosomal protein S12-1
57	Q9M879	SKP1-like protein 1B
58	Q9SIP1	Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase
59	Q9LHG9	Stress-response A/B barrel domain-containing protein UP3
60	Q9FFT4	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 1
61	Q6NMA9	Pyruvate decarboxylase 2
62	Q9STG9	At5g45170
63	O82204	Amidophosphoribosyltransferase 2
64	Q9SE60	60S ribosomal protein L28-1
65	O22287	Methylenetetrahydrofolate reductase 1
66	Q9M2W2	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase 1
67	O82299	Glutathione S-transferase L2
68	F4IRR2	Putative chloroplast RNA binding protein
69	Q9FM97	Importin beta-like SAD2
70	Q9FZ48	Pyruvate kinase
71	P46644	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 36
72	A0A1P8AU81	Aspartate aminotransferase 3
73	Q39026	Rhodanese homologue 2
74	Q9FK51	Mitogen-activated protein kinase 6
75	F4IG09	ADP-glucose phosphorylase
76	Q9LYF8	Subtilisin-like protease SBT4.1
77	A0A1P8BAQ0	AT5g11720/T22P22_110
78	Q9T080	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
79	Q9LQ04	UDP-glycosyltransferase 79B2 thaliana
80	Q8VZC3	Bifunctional dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase/dTDP-4-dehydrorhamnose reductase
81	Q8RW90	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 12A1
82	Q8H0U4	Fumarylacetoacetate
83	Q41931	Transportin-1
84	B9DGK2	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 2
85	Q8GUK4	AT2G35830 protein
86	O48646	Subtilisin-like protease SBT3.13
87	Q6DBH4	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 6

**Tableau S.3** Liste complète des protéines carbonylées identifiées dans trois réplicats biologiques des échantillons des plantes témoins (Suite 2)

<i>N</i>	<i>Protein ID</i>	<i>Protein name</i>
88	Q93W34	At2g23820
89	Q94K56	Polyadenylate-binding protein RBP45C
90	Q8L7N0	GrpE protein homolog
91	O22941	Insulin-degrading enzyme-like
92	F4JLMS	Isoleucine-tRNA ligase
93	A0A2H1ZEM8	Acylaminoacyl-peptidase-like protein
94	Q9SIU8	Probable protein phosphatase 2C 20
95	Q9FNA3	Alpha-N-acetylglucosaminidase
96	Q9LV21	T-complex protein 1 subunit delta
97	Q6ZY51	Phosphoglucan, water dikinase
98	Q9SX52	Phytochrome-associated serine/threonine-protein phosphatase 1
99	F4IKK4	Sinapoylglucose 1
100	P56772	Chloroplastic ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1
101	A0A1P8AMM6	Protein phosphatase 2A subunit A3
102	P24704	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 1
103	Q9M0S5	Isoamylase 3
104	O78310	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2
105	Q9FVR1	At1g32160/F3C3_6
106	Q9FLT0	Ribonuclease TUDOR 2
107	Q9LW20	Probable inactive shikimate kinase like 1
108	A0A178U9N5	PsbP domain protein (Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein)
109	Q9T076	Early nodulin-like protein 2
110	Q9SKT0	Protein THYLAKOID FORMATION 1
111	F4J9W8	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein
112	F4J4K6	Tubulin binding cofactor C domain-containing protein
113	Q9C7N5	GDSL esterase/lipase At1g29660
114	F4K4Q2	tRNA synthetase class I (I, L, M and V) family protein
115	F4KE63	Valine-tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial 2
116	Q8VZ57	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
117	Q9FK81	Stress-response A/B barrel domain-containing protein At5g22580
118	O04450	T-complex protein 1 subunit epsilon
119	Q39048	Protein ECERIFERUM 2
120	Q9FF98	MD-2-related lipid-recognition protein 3
121	Q9SIR5	AmmeMemoRadiSam system protein B
122	A0A2H1ZE37	HARMLESS TO OZONE LAYER 1
123	Q9XI05	Proteasome subunit beta type-3-A
124	Q93ZN9	LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic
125	F4IFC5	Threonine-tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial 2
126	A0A1I9LT6	Beta glucosidase 8
127	Q8W4M5	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta 1
128	O24521	Non-symbiotic hemoglobin 2
129	O64764	Thioredoxin O1
130	Q8S8F9	Nicotinamidase 1

**Tableau S.4** Liste complète des protéines carbonylées identifiées dans trois réplicats biologiques des échantillons des plantes témoins (Suite 3)

<i>N</i>	<i>Protein ID</i>	<i>Protein name</i>
131	Q9FFW8	Tryptophan synthase beta chain
132	Q9SYG7	Aldehyde dehydrogenase family 7 member B4
133	O23653	Aspartokinase 2
134	P82538	PsbP-like protein 1
135	Q9ZPZ4	T31J12.3 protein
136	Q9M2P7	Probable plastid-lipid-associated protein 9
137	Q9LPU8	Indole glucosinolate O-methyltransferase 4
138	Q9ASS6	Photosynthetic NDH subunit of luminal location 5
139	Q8L6Y1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14
140	O64640	Probable carboxylesterase 8
141	A8MQP6	Nascent polypeptide-associated complex (NAC)
142	Q75W54	Mannosylglycoprotein endo-beta-mannosidase
143	Q9SI96	Histone H2B.3
144	O80574	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase 1
145	A0A1R7T3K7	Electron transfer flavoprotein beta
146	F4IB62	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
147	A0A1P8AR70	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein
148	P54150	Peptide methionine sulfoxide reductase A4
149	Q9LFJ8	UDP-glycosyltransferase 78D2 PE=2 SV=1
150	Q8LFL5	At1g49975
151	Q9CAP1	At1g77670
152	Q9SN73	Dnaj/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein
153	P42801	Inositol-3-phosphate synthase isozyme 1
154	Q94K30	AT1G01800 protein
155	B3H5V4	Ubiquitin-specific protease 6
156	Q9C6D2	Methylthioribose kinase
157	Q9M0X9	4-coumarate--CoA ligase-like 7
158	Q9ZP15	Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP2
159	Q09152	Farnesyl pyrophosphate synthase 1
160	B3H757	MAP kinase kinase 2
161	Q8GRX2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J
162	F4K5B9	Eukaryotic aspartyl protease family protein
163	Q9C8W7	At1g71950

**Tableau S.5** Liste complète des protéines carbonylées identifiées dans trois réplicats biologiques des échantillons des plantes traitées avec l'ABA.

<i>N</i>	<i>Protein ID</i>	<i>Protein name</i>
1	Q9C5R8	2-Cys peroxiredoxin BAS1-like
2	B9DFR6	Cysteine synthase
3	P55217	Cystathionine gamma-synthase 1
4	Q9SUR0	Dehydrase and lipid transport superfamily protein
5	Q9S6Z7	Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase D1
6	Q9SAK4	Succinate-semialdehyde dehydrogenase
7	O65398	Lactoylglutathione lyase GLX1
8	Q9XI10	DPP6 N-terminal domain-like protein
9	Q9LXU4	Proline-tRNA ligase (DUF1680)
10	A0A1P8B8W6	Ascorbate peroxidase 4
11	Q9SIE3	Thioesterase superfamily protein
12	Q8L794	D-ribulose kinase
13	O22785	Pre-mRNA-processing factor 19 homolog 2
14	Q9M314	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
15	Q9LZX6	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase 1
16	Q9FM97	Pyruvate kinase
17	Q9T080	UDP-glycosyltransferase 79B2
18	O81876	Transmembrane protein
19	O22711	Peroxiredoxin-2D
20	Q9SMY7	Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 44
21	Q39054	Molybdopterin biosynthesis protein CNX1
22	Q9SRD4	Indole glucosinolate O-methyltransferase 5
23	F4J7T9	Aspartate-tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial
24	Q8L6Y1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14
25	Q9ZVQ2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
26	Q94K30	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein

**Tableau S.6** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes témoins. Le tableau montre le nombre de peptides identifiés et leur protéine de liaison dans un, deux et trois réplicats de plantes

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
1	Q9LHA8	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit	2	1	1
2	P22954	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c	0	0	1
3	F4JTQ0	ATPase, V1 complex, subunit B protein	2	1	0
4	Q0WNZ5	5-methyltetrahydropteroylglutamate--homocysteine methyltransferase 3	1	1	2
5	P29514	Tubulin beta-6 chain	2	0	1
6	Q9SJQ9	Fructose-bisphosphate aldolase 6	1	4	2
7	Q9M2T9	Methionine-tRNA ligase	8	13	7
8	P57751	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase 1	0	2	2
9	B9DFR6	Cysteine synthase	3	8	5
10	Q6XJG8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog B	3	2	1
11	Q9FI53	Fumarate hydratase 2	2	1	2
12	F4IVR2	Heat shock protein 60-2	2	1	2
13	A0A1P8AUM8	3-isopropylmalate dehydrogenase	2	2	2
14	Q93W22	60S ribosomal protein L10-3	1	2	1
15	O24616	Proteasome subunit alpha type-7-B	1	1	0
16	Q9FFP6	Pyruvate kinase	2	1	2
17	Q9SGA6	40S ribosomal protein S19-1	2	2	2
18	P42733	40S ribosomal protein S11-3	1	2	1
19	Q9LFX8	Glycine-rich protein	7	4	5
20	P93832	3-isopropylmalate dehydrogenase 2	0	1	2
21	P46637	Arginase 1	0	2	2
22	Q43348	Acid beta-fructofuranosidase 3	3	3	2
23	Q9MAH0	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	4	9	5
24	Q42262	40S ribosomal protein S3a-2	1	1	1
25	Q9FGX1	ATP-citrate synthase beta chain protein 2	1	0	1
26	O23717	Proteasome subunit beta type-5-A	1	3	3
27	P57720	Chorismate synthase	5	5	5
28	Q9XEX2	Peroxiredoxin-2B	3	4	4
29	Q9SUR0	Dehydrase and lipid transport superfamily protein	4	3	7
30	P48348	14-3-3-like protein GF14 kappa	0	2	3
31	Q9S6Z7	Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase D1	1	4	2
32	Q9C5C8	Peptide methionine sulfoxide reductase B2	6	3	5
33	Q9S9M7	Nuclear protein	4	8	6
34	Q8L7R2	Homoserine kinase	2	3	6
35	Q9ZU23	Jacalin-related lectin 5	3	6	4

**Tableau S.7** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes témoins (suite 1)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
36	Q9SXS7	Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase D2	2	0	2
37	Q9LVW7	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	2	5	7
38	Q9SAK4	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	4	5	3
39	Q9LZF5	Lectin-like protein	3	1	3
40	F4JFY5	Stromal ascorbate peroxidase	0	1	4
41	Q9C5J7	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 7	1	1	2
42	F4IHJ8	Ribosomal protein S25 family protein	1	2	2
43	Q84WM9	Elongation factor 1-beta 1	2	0	2
44	Q01525	14-3-3-like protein GF14 omega	1	2	2
45	O64688	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-3	2	0	0
46	Q9ZVA2	EP1-like glycoprotein 2	4	5	6
47	Q42546	SAL1 phosphatase	4	4	5
48	Q9C9D0	Cytosolic sulfotransferase 16	0	1	2
49	Q949W8	Xylulose kinase 2	0	5	3
50	Q38900	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-1	1	4	2
51	Q9XI22	F9L1.42 protein	2	3	3
52	O23714	Proteasome subunit beta type-2-A	0	1	2
53	Q93Z84	At2g04039/At2g04039	3	2	3
54	Q8VY70	Dimethylallyl, adenosine tRNA methylthiotransferase	2	3	4
55	Q76FS5	Solanesyl diphosphate synthase 2	2	4	4
56	Q9SSP5	Threonine synthase 2	0	1	0
57	O04314	PYK10-binding protein 1	1	1	4
58	Q9LT69	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 3	1	0	2
59	Q9SF85	Adenosine kinase 1	2	6	5
60	Q9LQQ3	RmlC-like cupins superfamily protein	4	3	4
61	Q42527	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase 2	5	3	3
62	Q9SR70	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP16-4	3	4	5
63	Q9SWG0	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	3	5	3
64	Q29Q34	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	2	5	6
65	F4JEL5	Eukaryotic translation initiation factor 4A1	1	4	1
66	Q8L7N0	T-complex protein 1 subunit zeta 2	3	1	2
67	Q9SGW3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 homolog A	3	4	3
68	O80763	Probable nucleoredoxin 1	1	6	4
69	Q9ZUF6	Subtilisin-like protease SBT1.8	2	2	2
70	Q8RWN9	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 2 of pyruvate dehydrogenase complex	0	2	1
71	Q9FE65	60S ribosomal protein L34-2	0	1	0
72	Q940P8	T-complex protein 1 subunit beta	3	1	3
73	Q8S904	Adrenodoxin-like protein 2	2	2	2

**Tableau S.8** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes témoins (suite 2)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
74	Q42406	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP18-4	2	3	3
75	F4J5J9	Cysteine proteinases superfamily protein	2	1	1
76	Q93VP3	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	1	1	4
77	O22785	Pre-mRNA-processing factor 19 homolog 2	1	2	2
78	Q9S9P1	40S ribosomal protein S12-1	2	2	2
79	Q9FWH7	SKP1-like protein 1B	3	2	5
80	Q9M879	Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase 5	1	1	2
81	Q9SIP1	Stress-response A/B barrel domain-containing protein UP3	3	3	3
82	Q9LHG9	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 1	1	3	3
83	Q9FFT4	Pyruvate decarboxylase 2	1	3	1
84	P93032	Isocitrate dehydrogenase [NAD] regulatory subunit 2	0	1	1
85	Q680P8	40S ribosomal protein S29	0	2	2
86	Q9LYT7	3-isopropylmalate dehydratase small subunit 2	0	3	3
87	Q6NMA9	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	1	1	3
88	O04130	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 2	1	2	0
44	Q01525	14-3-3-like protein GF14 omega		1	2
45	O64688	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-3		2	0
46	Q9ZVA2	EP1-like glycoprotein 2		4	5
47	Q42546	SAL1 phosphatase		4	4
48	Q9C9D0	Cytosolic sulfotransferase 16		0	1
49	Q949W8	Xylulose kinase 2		0	5
50	Q38900	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-1		1	4
51	Q9XI22	F9L1.42 protein		2	3
52	O23714	Proteasome subunit beta type-2-A		0	1
53	Q93Z84	At2g04039/At2g04039		3	2
54	Q8VY70	Dimethylallyl, adenosine tRNA methylthiotransferase		2	3
55	Q76FS5	Solanesyl diphosphate synthase 2		2	4
56	Q9SSP5	Threonine synthase 2		0	1
57	O04314	PYK10-binding protein 1		1	1
58	Q9LT69	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 3		1	0
59	Q9SF85	Adenosine kinase 1		2	6
60	Q9LQQ3	RmlC-like cupins superfamily protein		4	3
61	Q42527	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase 2		5	3
62	Q9SR70	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP16-4		3	4
63	Q9SWG0	Isovaleryl-CoA dehydrogenase		3	5
64	Q29Q34	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein		2	5
65	F4JEL5	Eukaryotic translation initiation factor 4A1		1	4

**Tableau S.9** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes témoins (suite 3)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
66	Q8L7N0	T-complex protein 1 subunit zeta 2	3	1	2
67	Q9SGW3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 homolog A	3	4	3
68	O80763	Probable nucleoredoxin 1	1	6	4
69	Q9ZUF6	Subtilisin-like protease SBT1.8	2	2	2
70	Q8RWN9	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 2 of pyruvate dehydrogenase complex	0	2	1
71	Q9FE65	60S ribosomal protein L34-2	0	1	0
72	Q940P8	T-complex protein 1 subunit beta	3	1	3
73	Q8S904	Adrenodoxin-like protein 2	2	2	2
74	Q42406	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP18-4	2	3	3
75	F4J5J9	Cysteine proteinases superfamily protein	2	1	1
76	Q93VP3	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	1	1	4
77	O22785	Pre-mRNA-processing factor 19 homolog 2	1	2	2
78	Q9S9P1	40S ribosomal protein S12-1	2	2	2
79	Q9FHW7	SKP1-like protein 1B	3	2	5
80	Q9M879	Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase 5	1	1	2
81	Q9SIP1	Stress-response A/B barrel domain-containing protein UP3	3	3	3
82	Q9LHG9	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 1	1	3	3
83	Q9FFT4	Pyruvate decarboxylase 2	1	3	1
84	P93032	Isocitrate dehydrogenase [NAD] regulatory subunit 2	0	1	1
85	Q680P8	40S ribosomal protein S29	0	2	2
86	Q9LYT7	3-isopropylmalate dehydratase small subunit 2	0	3	3
87	Q6NMA9	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	1	1	3
88	O04130	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 2	1	2	0
89	Q9STG9	Amidophosphoribosyltransferase 2		3	1
90	Q5XEP2	Hsp70-Hsp90 organizing protein 2		2	0
91	O82204	60S ribosomal protein L28-1		2	4
92	Q9SE60	Methylenetetrahydrofolate reductase 1		2	4
93	Q9SGY2	ATP-citrate synthase alpha chain protein 1		1	1
94	O22287	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase 1		2	2
95	Q9M2W2	Glutathione S-transferase L2		1	3
96	Q9LZX6	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase 1		0	2
97	Q06588	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 4		2	0
98	Q39173	NADP-dependent alkenal double bond reductase P2		1	1
99	O82299	Putative chloroplast RNA binding protein		2	3
100	F4IRR2	Importin beta-like SAD2		3	2
101	Q9FM97	Pyruvate kinase		1	1

**Tableau S.10** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes témoins (suite 4)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
102	Q9FZ48	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 36	1	2	2
103	P46644	Aspartate aminotransferase 3	1	2	1
104	A0A1P8AU81	Rhodanese homologue 2	1	3	2
105	Q9T0A0	Long chain acyl-CoA synthetase 4	4	2	0
106	Q39026	Mitogen-activated protein kinase 6	2	2	2
107	Q9FK51	ADP-glucose phosphorylase	2	3	3
108	F4IG09	Subtilisin-like protease SBT4.1	4	2	4
109	Q9LYF8	AT5g11720/T22P22_110	2	2	4
110	P31168	Dehydrin COR47	0	2	1
111	P42760	Glutathione S-transferase F6	0	2	2
112	F4IP55	General regulatory factor 9	0	0	2
113	A0A1P8BAQ0	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	2	3	3
114	Q9T080	UDP-glycosyltransferase 79B2	2	1	3
115	Q9LQ04	Bifunctional dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase/dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	1	1	2
116	Q8VZC3	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 12A1	2	1	3
117	Q9ZVA1	EP1-like glycoprotein 1	1	2	0
118	Q9ZW84	3-isopropylmalate dehydratase small subunit 1	0	2	0
119	Q8RW90	Fumarylacetoacetate	1	5	4
120	Q8H0U4	Transportin-1	2	1	2
121	Q9MAP3	50S ribosomal protein L11	0	2	1
122	Q41931	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 2	3	1	2
123	B9DGK2	Ureidoglycolate hydrolase	2	2	2
124	Q8RY94	Adenylosuccinate lyase	0	1	2
125	Q8GUK4	Subtilisin-like protease SBT3.13	3	4	2
126	O48646	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 6	1	2	4
127	Q6DBH4	Metal-dependent phosphohydrolase	3	1	1
128	Q9LVI9	Dihydropyrimidine dehydrogenase (NADP(+))	0	4	4
129	Q8GWU0	Phosphoglycolate phosphatase 2	0	3	3
130	O80585	Methylenetetrahydrofolate reductase 2	0	1	2
131	Q93W34	Polyadenylate-binding protein RBP45C	2	1	1
132	Q94K56	GrpE protein homolog	2	3	4
133	O22941	Insulin-degrading enzyme-like 1	2	2	3
134	F4JLM5	Isoleucine-tRNA ligase	2	3	2
135	A0A2H1ZEM8	Acylaminoacyl-peptidase-like protein	1	1	5
136	Q9SIU8	Probable protein phosphatase 2C	1	2	3
137	Q9FNA3	Alpha-N-acetylglucosaminidase	4	1	2
138	Q8S9M1	Probable plastid-lipid-associated protein 13	0	1	1
139	Q9LV21	T-complex protein 1 subunit delta	1	3	3
140	F4JC86	Ubiquitin family protein	0	2	3
141	Q6ZY51	Phosphoglucan water dikinase	1	1	3
142	Q8LPJ4	ABC transporter E family member 2	3	1	0

**Tableau S.11** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons de plantes témoins (suite 5)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
143	Q9SX52	Phytochrome-associated serine/threonine-protein phosphatase 1	3	3	2
144	O81644	Villin-2	2	0	2
145	Q9SKZ3	40S ribosomal protein S12-2	0	2	0
146	P06525	Alcohol dehydrogenase class-P	1	2	1
147	Q9SHP0	Phosphoserine aminotransferase 2	0	1	1
148	A0A1I9LM90	RNA-binding KH domain-containing protein	0	1	4
149	P46645	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic isozyme 1	2	1	0
150	F4IKK4	Sinapoylglucose 1	1	1	2
151	O23710	Proteasome subunit beta type-7-A	0	0	2
152	P56772	Chloroplastic ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1	1	2	2
153	P31169	Stress-induced protein KIN2	1	0	2
154	A0A1P8AMM6	Protein phosphatase 2A subunit A3	1	1	2
155	F4I7X1	SKU5-similar 6	0	0	2
156	P11832	Nitrate reductase [NADH] 1	3	0	0
157	P24704	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 1	1	2	2
158	P56808	30S ribosomal protein S19, chloroplastic	1	1	0
159	Q9M0S5	Isoamylase 3	2	3	3
160	O78310	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2	1	2	1
161	Q9FVR1	Beta-casein	4	1	1
162	Q9FLT0	Ribonuclease TUDOR 2	2	3	4
163	Q9LW20	Probable inactive shikimate kinase like 1	1	2	2
164	A0A178U9N5	PsbP domain protein (Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein)	2	1	2
165	Q9T076	Early nodulin-like protein 2 1	3	2	2
166	P61841	30S ribosomal protein S7	0	1	0
167	Q9SVG3	Berberine bridge enzyme-like 21	0	0	2
168	Q8VZF1	Acetate/butyrate--CoA ligase AAE7	1	1	1
169	Q9SKT0	Protein THYLAKOID FORMATION	3	1	2
170	F4J9W8	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein	2	1	1
171	F4J4K6	Tubulin binding cofactor C domain-containing protein	2	3	2
172	Q9FIZ7	5-oxoprolinase	2	1	0
173	Q9C7N5	GDSL esterase/lipase At1g29660	1	2	3
174	F4K4Q2	tRNA synthetase class I (L, M and V) family protein	2	2	1
175	F4KE63	Valine-tRNA ligase	4	2	3
176	F4JQ55	Chaperone protein htpG family protein	1	0	1
177	Q9SBA5	Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase 1	1	2	0
178	Q8VZ57	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	1	1	2

**Tableau S.12** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes témoins (suite 6)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
179	Q9FK81	Stress-response A/B barrel domain-containing protein A	2	3	2
180	P54873	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	0	2	3
181	Q9ZW19	Tropinone reductase homolog At2g29360	2	3	0
182	O04450	T-complex protein 1 subunit epsilon	1	3	3
183	Q39048	Protein ECERIFERUM 2	3	1	1
184	Q9FF98	MD-2-related lipid-recognition protein 3	2	1	2
185	Q9SIR5	AmmeMemoRadiSam system protein B	2	2	2
186	A0A2H1ZE37	HARMLESS TO OZONE LAYER 1	1	2	1
187	Q9XI05	Proteasome subunit beta type-3-A	2	3	2
188	O80925	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD7	3	1	2
189	Q501G7	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	2	1	0
190	A0A1P8AV08	Aspartic proteinase A1	1	1	0
191	Q93ZN9	LL-diaminopimelate aminotransferase	1	1	1
192	F4IFC5	Threonine-tRNA ligase	4	1	2
193	A0A1I9LTV6	Beta glucosidase 8	1	2	3
194	Q8W4M5	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta 1	2	2	1
195	Q9ZT91	Elongation factor Tu	1	2	0
196	O24521	Non-symbiotic hemoglobin 2	2	1	2
197	O64764	Thioredoxin O1, mitochondrial	2	2	3
198	Q9SRD4	Indole glucosinolate O-methyltransferase 5	0	2	2
199	Q8S8F9	Nicotinamidase 1	1	1	3
200	P93732	Proline iminopeptidase	0	1	3
201	Q9SSG3	HIPL1 protein	1	1	2
201	Q9FFW8	Tryptophan synthase beta chain	2	1	1
203	A0A1P8BAA4	Cytidine/deoxycytidylate deaminase family protein	0	1	3
204	A0A1P8B223	Ureidoglycolate hydrolase	2	2	0
205	Q9SSN5	Similar to part of disease resistance protein	1	1	0
206	Q9FJD4	Importin subunit beta-1	1	0	1
207	Q9SYG7	Aldehyde dehydrogenase family 7 member B4	1	1	2
208	O23653	Aspartokinase 2	2	2	1
209	F4J7T9	Aspartate-tRNA ligase	3	0	1
210	Q9LXZ4	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	2	0	2
211	Q9CAT7	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	1	1	1
212	P82538	PsbP-like protein 1	2	1	1
213	Q9ZPZ4	T31J12.3 protein	2	1	1
214	Q8GUN2	Adenylylsulfatase HINT1	1	0	2
215	Q8H7F6	Bifunctional monothiol glutaredoxin-S16	0	2	1
216	Q9LVM3	YCF54	0	1	0

**Tableau S.13** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes témoins (suite 7)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
217	Q9SJI7	Phospholipase A1-IIdelta	1	0	2
218	Q9M2P7	Probable plastid-lipid-associated protein 9	1	1	2
219	Q9LPU8	Indole glucosinolate O-methyltransferase 4	1	2	1
220	Q9ASS6	Photosynthetic NDH subunit of luminal location 5	1	1	2
221	Q8L6Y1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	1	1	2
222	O23722	Diphosphomevalonate decarboxylase MVD1	1	1	0
223	Q8GW78	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit CLPT2	0	1	2
224	Q6DBI9	Halocid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	0	0	2
225	Q94CB1	Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 25	0	1	3
226	Q9FPH3	Probable low-specificity L-threonine aldolase 2	0	0	2
227	Q9LEU8	Argininosuccinate lyase	1	1	1
228	Q8VYM4	30S ribosomal protein 2	1	2	0
229	P92981	5'-adenylylsulfate reductase 2	2	0	0
230	O64640	Probable carboxylesterase 8	1	2	2
231	A8MQP6	Nascent polypeptide-associated complex (NAC), alpha subunit family protein	1	3	2
232	Q75W54	Mannosylglycoprotein endo-beta-mannosidase	2	1	2
233	Q9FMF1	Inositol monophosphatase family protein	0	1	2
234	Q9SW96	Asparagine-tRNA ligase	0	0	2
235	Q9SI96	Histone H2B.3	2	1	1
236	O80574	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase 1	2	1	1
237	A0A1R7T3K7	Electron transfer flavoprotein beta	1	1	2
238	F4IB62	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	2	2	1
239	A0A1P8AR70	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein	1	4	1
240	Q9ZVQ2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	1	1	0
241	P54150	Peptide methionine sulfoxide reductase A4	1	1	3
242	F4IWV2	2-oxoglutarate dehydrogenase	1	0	0
243	P35133	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 10 1	1	2	1
244	P13114	Chalcone synthase	0	3	0
245	O04603	50S ribosomal protein L5	0	1	0
246	Q42529	Tryptophan synthase alpha chain	2	2	0
247	Q6NLQ7	Monofunctional riboflavin biosynthesis protein RIBA 2	1	0	1
248	Q9LFJ8	UDP-glycosyltransferase 78D2	1	2	1
249	Q9M328	Universal stress protein, USP17	1	0	1
250	Q8LFL5	photosystem I reaction center subunit N	1	1	3
251	Q9LP53	Alba DNA/RNA-binding protein	0	1	2
252	O48802	Protein CLMP1 1	0	3	0

**Tableau S.14** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes témoins (suite 8)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
253	P49040	Sucrose synthase 1	1	1	1
254	Q8H126	Selenoprotein O	1	0	1
255	Q9CAP1	At1g77670	1	2	1
256	Q8H124	Uncharacterized protein At2g34460	2	1	2
257	Q9SN73	DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein	1	1	1
258	A0A1P8B6F9	CTP synthase	2	0	1
259	P42801	Inositol-3-phosphate synthase isozyme 1	1	1	1
260	Q94K30	AT1G01800 protein	1	1	1
261	A8MRK6	Nucleosome assembly protein 12	1	2	1
262	P35510	Phenylalanine ammonia-lyase 1	1	0	1
263	Q8VXY0	Expressed protein	1	0	1
264	F4J1Y2	Uncharacterized protein	1	0	1
265	Q9FGH3	Cinnamoyl-CoA reductase-like protein 1	3	1	0
266	A7WM73	Beta-hexosaminidase 1	1	3	0
267	Q6NQA8	Probable apyrase 5	2	1	0
268	Q9SIE1	Bifunctional aspartate aminotransferase and glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase	0	2	3
269	O23034	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	2	0	2
270	A0A1P8B9Q2	Aluminum induced protein with YGL and LRDR motifs	0	0	2
271	Q9LHA6	TRAF-like family protein;	2	0	1
272	Q93Z10	Regulator of chromosome condensation	1	2	1
273	B3H5V4	Ubiquitin-specific protease 6	1	1	1
274	F4ICX9	TSK-associating protein 1	2	0	1
275	A1A6F3	BNR/Asp-box repeat family protein	2	1	2
276	Q9LK47	S1 RNA-binding ribosomal protein 1	0	2	1
277	Q9FFG6	Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy) asparagine amidase A	0	0	2
278	Q9C6D2	Methylthioribose kinase	1	2	1
279	Q9SU79	Probable polyamine oxidase 5	0	2	1
280	Q9M0X9	4-coumarate-CoA ligase-like 7	2	2	1
281	Q9C8M2	Peptide methionine sulfoxide reductase B1	1	0	1
282	Q93VC7	30S ribosomal protein S1	1	2	0
283	Q9C5K7	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 2	1	1	0
284	Q9ZP15	Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP2	1	1	2
285	Q9M0E2	60S ribosomal protein L28-2	0	1	1
286	Q09152	Farnesyl pyrophosphate synthase 1	1	1	2
287	Q8W593	Probable lactoylglutathione lyase	2	0	1
288	B3H757	MAP kinase kinase 2	2	1	1
289	A8MSB9	Glycine-rich RNA-binding protein 2	0	2	1

**Tableau S.15** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes témoins (suite 9)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
290	Q8GRX2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	1	1	1
291	O23290	60S ribosomal protein L36a	0	1	1
292	Q9ZW26	Glutathione S-transferase U6	0	1	2
293	A0A1P8APN5	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	2	0	0
294	Q9FFP9	Serine/threonine-protein kinase SRK2H	2	1	1
295	F4I2I5	Guanylate-binding family protein	1	1	1
296	F4K5B9	Eukaryotic aspartyl protease family protein	1	1	1
297	Q9SXE9	At1g62480/T3P18_4	0	1	0
298	Q96262	Plasma membrane-associated cation-binding protein 1	1	1	0
299	Q9SYL9	50S ribosomal protein L13	0	1	0
300	F4JK28	Mitochondrial transcription termination factor family protein	1	1	1
301	Q84W65	SufE-like protein 1	2	0	1
302	Q94JT5	Cyclase-like protein 2	0	2	0
303	Q9FIJ7	Adenylate kinase 2	0	1	2
304	O23016	Probable voltage-gated potassium channel subunit beta	1	1	0
305	P0DKI3	Tropinone reductase homolog At1g07440	0	1	1
306	F4I448	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	3	0	0
307	Q9LT39	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	1	0	0
308	Q9SSA5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38	2	0	0
309	P93028	Ubiquitin-activating enzyme E1 1	0	1	1
310	A0A1P8B687	Inosine triphosphate pyrophosphatase	1	0	1
311	O04202	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	0	1	0
312	Q41188	Cold shock protein 2	0	1	1
313	Q9CAI3	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 1	1	0	0
314	Q9FGS4	Quinolinate synthase1	1	2	0
315	F4IPY2	Cysteine-tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial	1	2	0
316	Q9LVQ8	Probable protein phosphatase 2C 80	0	0	2
317	Q9FRL8	Glutathione S-transferase DHAR2	1	1	1
318	Q8LBB2	SNF1-related protein kinase regulatory subunit gamma-1	2	0	1
319	Q8VWG7	TPR repeat-containing thioredoxin TDX	1	0	2
320	O48832	Protein EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 7	0	1	1
321	A0A1P8APU0	Thylakoidal ascorbate peroxidase	0	1	1
322	P51412	50S ribosomal protein L21	0	1	0
323	Q9LVC5	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	0	3	1
324	A0A1P8B1E5	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	1	1	0

**Tableau S.16** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes témoins (suite 10)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
325	A0A1P8B8F8	Endo-1,4-beta-xylanase 5	0	1	2
326	O23049	50S ribosomal protein L6	0	2	0
327	P50287	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 1	0	0	2
328	Q8L7K9	NAD-dependent malic enzyme 2	1	1	1
329	Q9LV09	Protein BOBBER 1	0	0	2
330	A0A1P8B894	Carboxypeptidase 1	0	1	2
331	Q9FR44	Phosphoethanolamine N-methyltransferase 1	0	3	1
332	Q9C5Z2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	0	2	0
333	Q0WMN5	Uncharacterized protein At3g49140	1	0	0
334	Q9MB58	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase	2	0	0
335	Q9FHY8	Protein HLB1	0	1	0
336	Q0WM93	AAA-type ATPase family protein	1	1	0
337	Q9C8W7	subtilisin propeptide-like inhibitor 1	1	1	1
338	Q42566	ATsEH	1	1	0
339	Q9SVD1	Eukaryotic aspartyl protease family protein	1	0	1
340	Q682E0	Catalytic/ hydrolase	1	0	2
341	A0A1I9LLZ2	SIT4 phosphatase-associated family protein	1	1	0
342	F4JM15	PfkB-like carbohydrate kinase family protein	0	1	1
343	Q7Y208	Glycerophosphodiester phosphodiesterase GDPDL1	1	1	0
344	O22609	Protease Do-like 1	0	1	2
345	Q9LFY3	At1g27030/T7N9_9	0	1	1
346	O23401	UDP-glycosyltransferase 84A3	0	1	1
347	O49006	Pectinesterase/pectinesterase inhibitor 3	0	0	2
348	Q9ZSK3	Actin-depolymerizing factor 4	2	0	0
349	Q9SLV3	TRAF-like family protein	0	0	3
350	Q9SIZ2	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha homolog	2	0	0
351	Q84TL2	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase like protein	2	0	0
352	Q39061	RNA-binding protein CP33	0	2	0
353	Q9LVU3	YDG domain-containing protein At5g47160	0	0	2
354	F4JTK8	Peptidase M20/M25/M40 family protein	0	0	2
355	Q9ZW24	Glutathione S-transferase U7 1	1	1	0
356	Q8LL04	RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase-like 3	1	0	1
357	Q9LZG7	Glutathione S-transferase U27	0	0	1
358	O22793	Multiple organellar RNA editing factor 21	0	1	0
359	F4IKQ3	Tim10/DDP family zinc finger protein	0	1	1
360	Q9M4B5	Probable prefoldin subunit 4	0	0	2
361	Q9LU10	Protease Do-like 8	0	1	1
362	Q8GSJ1	ATP phosphoribosyltransferase 2	0	1	1
363	O80944	Aldo-keto reductase family 4 member C8	0	0	2

**Tableau S.17** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes témoins (suite 11)

364	Q9SUT5	Protein SGT1 homolog B	0	1	2
365	Q9LZR5	Histone deacetylase HDT3	0	0	2

**Tableau S.18** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes traitées avec l'ABA. Le tableau montre le nombre de peptides identifiés et leur protéine de liaison dans un, deux et trois réplicats.

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
1	Q9C5R8	2-Cys peroxiredoxin BAS1-like	1	3	3
2	O81149	Proteasome subunit alpha type-5-A	2	2	0
3	B9DFR6	Cysteine synthase	4	4	3
4	Q93W22	60S ribosomal protein L10-3	0	1	1
5	O24616	Proteasome subunit alpha type-7-B	0	1	1
6	P93832	3-isopropylmalate dehydrogenase 2	0	1	2
7	P55217	Cystathionine gamma-synthase 1	4	6	6
8	Q9SUR0	Dehydrase and lipid transport superfamily protein	2	3	3
9	Q9S6Z7	Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase D1	1	1	2
10	Q9SXS7	Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase D2	1	0	1
11	Q9SAK4	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	1	3	3
12	O65398	Lactoylglutathione lyase GLX1	3	2	6
13	Q9XI10	DPP6 N-terminal domain-like protein	1	2	1
14	O64688	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-3	1	1	0
15	Q9SSP5	Threonine synthase 2	0	2	1
16	Q9LXU4	Proline-tRNA ligase (DUF1680)	2	2	2
17	Q9FFN4	Beta-galactosidase 6	0	1	0
18	A0A1P8B8W6	Ascorbate peroxidase 4	4	2	3
19	Q29Q34	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0	3	2
20	O80763	Probable nucleoredoxin 1	0	2	1
21	Q9SIE3	At2g22230/T26C19.11	2	2	2
22	Q9FE65	60S ribosomal protein L34-2	1	1	1
23	Q8L794	D-ribulose kinase	1	3	2
24	O22785	Pre-mRNA-processing factor 19 homolog 2	1	2	3
25	Q9M879	Stearoyl-[acyl-carrier-protein] 9-desaturase 5	0	1	0
26	Q9FFT4	Pyruvate decarboxylase 2	0	1	4
27	P93032	Isocitrate dehydrogenase [NAD] regulatory subunit 2	1	0	0
28	F4IYK3	ARM repeat superfamily protein	1	0	0
29	Q9LYT7	3-isopropylmalate dehydratase small subunit 2	0	1	2
30	Q9SE60	Methylenetetrahydrofolate reductase 1	0	1	0
31	Q9SGY2	ATP-citrate synthase alpha chain protein 1	0	3	1
32	Q9M314	AT3g61540/F2A19_140	1	1	4
33	Q9LZX6	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase 1	1	1	1
34	Q9FM97	Pyruvate kinase	1	2	1
35	Q39026	Mitogen-activated protein kinase 6	0	2	1
36	F4IG09	Subtilisin-like protease SBT4.1	1	1	0
37	P31168	Dehydrin COR47	0	1	0

**Tableau S.19** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes traitées avec l'ABA (Suite 1)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
38	Q9T080	UDP-glycosyltransferase 79B2	2	2	2
39	Q8H0U4	Transportin-1	1	1	0
40	Q9M1X2	Fatty-acid-binding protein 1	2	1	0
41	Q9MAP3	50S ribosomal protein L11	0	1	0
42	Q41931	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 2	0	1	1
43	A0A2H1ZEM8	Acylaminoacyl-peptidase-like protein	0	2	2
44	Q8S9M1	Probable plastid-lipid-associated protein 13	0	1	2
45	O81876	Transmembrane protein	2	2	1
46	Q9SX52	Phytochrome-associated serine/threonine-protein phosphatase 1	0	1	2
47	F4IKK4	Sinapoylglucose 1	0	2	1
48	O22711	Peroxiredoxin-2D	1	1	1
49	Q9FKG3	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 4	1	1	0
50	A0A1P8AMM6	Protein phosphatase 2A subunit A3	0	1	0
51	Q9SMY7	Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 44	2	2	1
52	F4IKM1	Tropinone reductase homolog At2g29340	1	1	1
53	F4J4K6	Tubulin binding cofactor C domain-containing protein	1	0	0
54	F4KE63	Valine-tRNA ligase	0	0	1
55	F4JQ55	Chaperone protein htpG family protein	0	1	1
56	Q9FH05	Serine carboxypeptidase-like 42	1	2	1
57	Q9M8R4	Protein DJ-1 homolog D	1	0	2
58	O04450	T-complex protein 1 subunit epsilon	0	1	1
59	Q9XI05	Proteasome subunit beta type-3-A	0	3	1
60	Q39054	Molybdopterin biosynthesis protein CNX1	1	1	2
61	Q93ZV1	Metal-dependent phosphohydrolase	0	1	1
62	A0A1I9LTV6	Beta glucosidase 8	1	0	0
63	Q9SRD4	Indole glucosinolate O-methyltransferase 5	1	2	1
64	Q8S8F9	Nicotinamidase 1	0	1	1
65	Q9C658	Protein decapping 5	1	1	2
66	Q9FFW8	Tryptophan synthase beta chain 1	1	0	0
67	Q9SSN5	Similar to part of disease resistance protein	0	0	1
68	F4JJT9	Aspartate-tRNA ligase	1	1	1
69	Q9LXZ4	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	0	1	1
70	Q9CAT7	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	0	0	1
71	P82538	PsbP-like protein 1	0	1	0
72	Q9LVM3	YCF54 1	0	2	0
73	Q8L6Y1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	1	1	1
74	Q9FMF1	AT5g64380/MSJ1_22	1	0	2
75	Q9SX22	30S ribosomal protein 3-1	0	2	1
76	A0A1R7T3K7	Electron transfer flavoprotein beta 1	1	1	0

**Tableau S.20** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes traitées avec l'ABA (Suite 2)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
77	A0A1P8AR70	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein	1	0	0
78	Q9ZVQ2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	1	2	1
79	P35133	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	0	1	1
80	P13114	Chalcone synthase	0	1	0
81	Q6NLQ7	Monofunctional riboflavin biosynthesis protein RIBA 2	0	0	1
82	Q8RUF8	Omega-amidase	1	2	0
83	O22797	Glycolipid transfer protein 1	1	1	1
84	F4JSP1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0	1	0
85	Q9SN73	DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein	0	1	0
86	Q94K30	AT1G01800 protein	1	1	1
87	A7WM73	Beta-hexosaminidase 1	0	1	1
88	A0A1P8B9Q2	Aluminum induced protein with YGL and LRDR motifs	0	1	1
89	B3H5V4	Ubiquitin-specific protease 6	0	0	2
90	A1A6F3	BNR/Asp-box repeat family protein	1	0	0
91	F4K0T5	Anthranilate synthase alpha subunit 1	1	1	0
92	Q9C6D2	Methylthioribose kinase	0	1	1
93	Q9ZW13	Tropinone reductase homolog At2g29290	2	0	1
94	A0A1P8B8R9	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	1	0	0
95	Q09152	Farnesyl pyrophosphate synthase 1	0	1	1
96	Q8W593	Probable lactoylglutathione lyase	1	0	2
97	A8MSB9	Glycine-rich RNA-binding protein 2	0	1	1
98	Q96262	Plasma membrane-associated cation-binding protein 1	0	1	1
99	A0A1P8B982	Tautomerase/MIF superfamily protein	0	1	1
100	F4JK28	Mitochondrial transcription termination factor family protein	0	1	0
101	Q94JT5	Cyclase-like protein 2	1	0	0
102	P0DKI3	Tropinone reductase homolog At1g07440	0	0	2
103	Q9SSA5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38	0	0	1
104	P93028	Ubiquitin-activating enzyme E1 1	1	0	0
105	O04202	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	1	2	0
106	F4IPY2	Cysteine-tRNA ligase	1	0	0
107	Q9XJ27	30S ribosomal protein S9	1	2	1
108	Q9M0G0	Glutathione hydrolase 3	0	2	0
109	Q9LV09	Protein BOBBER 1	0	0	2
110	A0A1P8B894	Carboxypeptidase	0	0	2
111	Q9C5Z2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	0	2	1
112	Q0WMN5	Uncharacterized protein At3g49140	2	0	0

**Tableau S.21** Liste des protéines carbonylées identifiées dans au moins un réplicat biologique des échantillons des plantes traitées avec l'ABA (Suite 3)

N	Protein ID	Protein name	Replicate1	Replicate2	Replicate3
113	Q9FHY8	Protein HLB1	0	2	0
114	Q0WM93	AAA-type ATPase family protein	0	0	1
115	F4JM15	PfkB-like carbohydrate kinase family protein	0	0	1
116	P56801	30S ribosomal protein S81	0	1	1
117	Q93VK7	AT5g14910/F2G14_30	1	2	1
118	Q84TI2	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase like protein	0	1	0
119	Q8H0W0	Protein LOW PSII ACCUMULATION 3	1	0	0
120	Q9CA21	Pleckstrin homology (PH) domain superfamily protein	0	2	0
121	Q9LZG7	Glutathione S-transferase U27	1	1	0
122	O22793	Multiple organellar RNA editing factor 2	1	1	0
123	Q9M4B5	Probable prefoldin subunit 4	0	0	1
124	A0A1P8BDF2	Importin subunit alpha	0	2	0

## PUBLICATIONS

Jaballi A\*, Missihoun TD. (2022). The phytohormone abscisic acid modulates protein carbonylation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*.  
<https://doi.org/10.1111/ppl.13658> Accepted

Tola AJ\*, Jaballi A\*, Missihoun TD. (2021). Protein Carbonylation: Emerging Roles in Plant Redox Biology and Future Prospects. *Plants*. 10(7):1451.  
<https://doi.org/10.3390/plants10071451>

Tola AJ\*, Jaballi A\*, Germain H, Missihoun TD. (2021). Recent Development on Plant Aldehyde Dehydrogenase Enzymes and Their Functions in Plant Development and Stress Signaling. *Genes*. 12(1):51.  
<https://doi.org/10.3390/genes12010051>

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Liliane, T.N, and M.S. Charles, *Factors affecting yield of crops*. Agronomy-climate change & food security, 2020: p. 9.
2. Devireddy, A.R., et al., *Integration of reactive oxygen species and hormone signaling during abiotic stress*. The Plant Journal, 2021. 105(2): p. 459-476.
3. Giorgio, M., et al., *Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8(9): p. 722-8.
4. Liochev, S.I., *Reactive oxygen species and the free radical theory of aging*. Free Radical Biology and Medicine, 2013. 60: p. 1-4.
5. Rhee, S.G., *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling*. Science, 2006. 312(5782): p. 1882-1883.
6. Dietz, K.-J., I. Turkan, and A. Krieger-Liszkay, *Redox-and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast*. Plant Physiology, 2016. 171(3): p. 1541-1550.
7. Gilroy, S., et al., *ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants*. Plant physiology, 2016. 171(3): p. 1606-1615.
8. Huang, S., et al., *The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants*. Plant physiology, 2016. 171(3): p. 1551-1559.
9. Quan, L.J., et al., *Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network*. Journal of Integrative Plant Biology, 2008. 50(1): p. 2-18.
10. Huang, S., O. Van Aken, and M. Schwarzländer, *Belt K1, Millar AH*. The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. Plant Physiol, 2016. 171: p. 1551-4.
11. Kerchev, P., et al., *Lack of GLYCOLATE OXIDASE1, but not GLYCOLATE OXIDASE2, attenuates the photorespiratory phenotype of CATALASE2-deficient *Arabidopsis**. Plant Physiology, 2016. 171(3): p. 1704-1719.
12. Mittler, R., et al., *Reactive oxygen gene network of plants*. Trends in plant science, 2004. 9(10): p. 490-498.
13. Voothuluru, P., et al., *Apoplastic hydrogen peroxide in the growth zone of the maize primary root. Increased levels differentially modulate root elongation under well-watered and water-stressed conditions*. Frontiers in plant science, 2020. 11: p. 392.
14. Van Breusegem, F, and J.F. Dat, *Reactive oxygen species in plant cell death*. Plant physiology, 2006. 141(2): p. 384-390.
15. Cross, C.E., et al., *Oxygen radicals and human disease*. Annals of internal medicine, 1987. 107(4): p. 526-545.
16. Potters, G., N. Horemans, and M.A. Jansen, *The cellular redox state in plant stress biology—a charging concept*. Plant Physiology and Biochemistry, 2010. 48(5): p. 292-300.

17. Foyer, C.H, and G. Noctor, *Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications*. *Antioxidants & redox signaling*, 2009. **11**(4): p. 861-905.
18. Corpas, F.J., J.B. Barroso, and L.A. del Rio, *Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells*. *Trends in plant science*, 2001. **6**(4): p. 145-150.
19. Bright, J., et al., *ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis*. *The Plant Journal*, 2006. **45**(1): p. 113-122.
20. Shivaraj, S.M., et al., *Nitric oxide and hydrogen sulfide crosstalk during heavy metal stress in plants*. *Physiologia Plantarum*, 2020. **168**(2): p. 437-455.
21. Desikan, R., J. Hancock, and S. Neill, *Reactive oxygen species as signalling molecules*. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, 2005: p. 169-196.
22. Davies, P.J., *The plant hormones: their nature, occurrence, and functions*, in *Plant hormones*. 2010, Springer. p. 1-15.
23. Bechtold, U, and B. Field, *Molecular mechanisms controlling plant growth during abiotic stress*. 2018, Oxford University Press UK. p. 2753-2758.
24. Kuromori, T., M. Seo, and K. Shinozaki, *ABA transport and plant water stress responses*. *Trends in plant science*, 2018. **23**(6): p. 513-522.
25. Cortleven, A., et al., *Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants*. *Plant, Cell & Environment*, 2019. **42**(3): p. 998-1018.
26. Ding, P, and Y. Ding, *Stories of salicylic acid: a plant defense hormone*. *Trends in plant science*, 2020. **25**(6): p. 549-565.
27. Nolan, T.M., et al., *Brassinosteroids: multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses*. *The Plant Cell*, 2020. **32**(2): p. 295-318.
28. Xia, X.-J., et al., *Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance*. *Journal of experimental botany*, 2015. **66**(10): p. 2839-2856.
29. Mignolet-Spruyt, L., et al., *Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling*. *Journal of experimental botany*, 2016. **67**(13): p. 3831-3844.
30. Choudhury, F.K., et al., *Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination*. *The Plant Journal*, 2017. **90**(5): p. 856-867.
31. Kanojia, A, and P.P. Dijkwel, *Abiotic stress responses are governed by reactive oxygen species and age*. *Annual plant reviews online*, 2018: p. 295-326.
32. Asgher, M., et al., *Minimising toxicity of cadmium in plants—role of plant growth regulators*. *Protoplasma*, 2015. **252**(2): p. 399-413.
33. Ljung, K., *Auxin metabolism and homeostasis during plant development*. *Development*, 2013. **140**(5): p. 943-950.
34. Kieber, J.J, and G.E. Schaller, *Cytokinins*. The *Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 2014. **12**.
35. Argueso, C.T., et al., *Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity*. *PLoS Genetics*, 2012. **8**(1): p. e1002448.

36. Akhtar, S.S., et al., *Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects*. Frontiers in Plant Science, 2020. **10**: p. 1777.
37. Wani, S.H., et al., *Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants*. The Crop Journal, 2016. **4**(3): p. 162-176.
38. Groen, S.C, and N.K. Whiteman, *The evolution of ethylene signaling in plant chemical ecology*. Journal of chemical ecology, 2014. **40**(7): p. 700-716.
39. Shi, Y., et al., *Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in Arabidopsis*. The Plant Cell, 2012. **24**(6): p. 2578-2595.
40. Kazan, K., *Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance*. Trends in plant science, 2015. **20**(4): p. 219-229.
41. Olszewski, N., T.-p. Sun, and F. Gubler, *Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways*. The Plant Cell, 2002. **14**(suppl\_1): p. S61-S80.
42. Ahmad, P., *Growth and antioxidant responses in mustard (Brassica juncea L.) plants subjected to combined effect of gibberellic acid and salinity*. Archives of Agronomy and Soil Science, 2010. **56**(5): p. 575-588.
43. Iqbal, M. and M. Ashraf, *Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: Growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis*. Environmental and Experimental Botany, 2013. **86**: p. 76-85.
44. Manjili, F.A., M. Sedghi, and M. Pessarakli, *Effects of phytohormones on proline content and antioxidant enzymes of various wheat cultivars under salinity stress*. Journal of plant nutrition, 2012. **35**(7): p. 1098-1111.
45. Fahad, S., et al., *Crop plant hormones and environmental stress*. Sustainable agriculture reviews, 2015: p. 371-400.
46. Pauwels, L., D. Inzé, and A. Goossens, *Jasmonate-inducible gene: what does it mean?* Trends in plant science, 2009. **14**(2): p. 87-91.
47. Simaei, M., R. Khavari-Nejad, and F. Bernard, *Exogenous application of salicylic acid and nitric oxide on the ionic contents and enzymatic activities in NaCl-stressed soybean plants*. 2012.
48. Nambara, E., and A. Marion-Poll, *Abscisic acid biosynthesis and catabolism*. Annu. Rev. Plant Biol., 2005. **56**: p. 165-185.
49. Wasilewska, A., et al., *An update on abscisic acid signaling in plants and more....* Molecular plant, 2008. **1**(2): p. 198-217.
50. Cutler, S.R., et al., *Abscisic acid: emergence of a core signaling network*. Annual review of plant biology, 2010. **61**: p. 651-679.
51. Ohkuma, K., et al., *The structure of abscisic acid II*. Tetrahedron letters, 1965. **6**(29): p. 2529-2535.
52. Cornforth, J., B. Milborrow, and G. Ryback, *Synthesis of (±)-abscisic acid II*. Nature, 1965. **206**(4985): p. 715-715.
53. Berli, F., *Respuesta de Vitis vinifera L. cv. Malbec a UV-B y ABA*. 2011, Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias.
54. Seo, M, and T. Koshiba, *Complex regulation of ABA biosynthesis in plants*. Trends in plant science, 2002. **7**(1): p. 41-48.

55. Long, H., et al., *An abscisic acid (ABA) homeostasis regulated by its production, catabolism and transport in peanut leaves in response to drought stress*. PLoS One, 2019. 14(6): p. e0213963.
56. Sharma, K.D, and H. Nayyar, *Regulatory networks in pollen development under cold stress*. Frontiers in plant science, 2016. 7: p. 402.
57. Boursiac, Y., et al., *ABA transport and transporters*. Trends in plant science, 2013. 18(6): p. 325-333.
58. Shinozaki, K, and K. Yamaguchi-Shinozaki, *Gene networks involved in drought stress response and tolerance*. Journal of experimental botany, 2007. 58(2): p. 221-227.
59. Mittler, R, and E. Blumwald, *The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation*. The Plant Cell, 2015. 27(1): p. 64-70.
60. Sreenivasulu, N., S. Sopory, and P.K. Kishor, *Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches*. Gene, 2007. 388(1-2): p. 1-13.
61. Hirayama, T, and K. Shinozaki, *Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future*. The Plant Journal, 2010. 61(6): p. 1041-1052.
62. Raghavendra, A.S., et al., *ABA perception and signalling*. Trends in plant science, 2010. 15(7): p. 395-401.
63. Debnath, M., M. Pandey, and P. Bisen, *An omics approach to understand the plant abiotic stress*. Omics: a journal of integrative biology, 2011. 15(11): p. 739-762.
64. Fujita, Y., et al., *ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants*. Journal of plant research, 2011. 124(4): p. 509-525.
65. Ma, Y., et al., *Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors*. Science, 2009. 324(5930): p. 1064-1068.
66. Park, S.-Y., et al., *Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins*. science, 2009. 324(5930): p. 1068-1071.
67. Kwak, J.M., et al., *NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis*. The EMBO journal, 2003. 22(11): p. 2623-2633.
68. Sirichandra, C., et al., *Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase*. FEBS letters, 2009. 583(18): p. 2982-2986.
69. Pei, Z.-M., et al., *Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells*. Nature, 2000. 406(6797): p. 731-734.
70. Lee, S.C., et al., *A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. 106(50): p. 21419-21424.
71. Vahisalu, T., et al., *Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1*. The Plant Journal, 2010. 62(3): p. 442-453.
72. Sato, A., et al., *Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase*. Biochemical Journal, 2009. 424(3): p. 439-448.

73. Qi, J., et al., *Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack*. Journal of integrative plant biology, 2018. **60**(9): p. 805-826.
74. Aliniaiefard, S., and U. van Meeteren, *Can prolonged exposure to low VPD disturb the ABA signalling in stomatal guard cells?* Journal of Experimental Botany, 2013. **64**(12): p. 3551-3566.
75. Zhang, J., et al., *Precise control of ABA signaling through post-translational protein modification*. Plant Growth Regulation, 2019. **88**(2): p. 99-111.
76. Segal, A.W., and A. Abo, *The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes*. Trends in biochemical sciences, 1993. **18**(2): p. 43-47.
77. Keller, T., et al., *A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91 phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs*. The Plant Cell, 1998. **10**(2): p. 255-266.
78. Zhang, X., et al., *Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in Vicia faba*. Plant physiology, 2001. **126**(4): p. 1438-1448.
79. Mène-Saffrané, L., et al., *Genetic removal of tri-unsaturated fatty acids suppresses developmental and molecular phenotypes of an Arabidopsis tocopherol-deficient mutant: Whole-body mapping of malondialdehyde pools in a complex eukaryote*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(49): p. 35749-35756.
80. Farmer, E.E., and M.J. Mueller, *ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling*. Annual review of plant biology, 2013. **64**: p. 429-450.
81. Møller, I.M., P.E. Jensen, and A. Hansson, *Oxidative modifications to cellular components in plants*. Annu. Rev. Plant Biol., 2007. **58**: p. 459-481.
82. Fritz, K.S., and D.R. Petersen, *Exploring the biology of lipid peroxidation-derived protein carbonylation*. Chemical research in toxicology, 2011. **24**(9): p. 1411-1419.
83. Orioli, M., et al., *LC-ESI-MS/MS determination of 4-hydroxy-trans-2-nonenal Michael adducts with cysteine and histidine-containing peptides as early markers of oxidative stress in excitable tissues*. Journal of Chromatography B, 2005. **827**(1): p. 109-118.
84. Esterbauer, H., P. Eckl, and A. Ortner, *Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors*. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 1990. **238**(3): p. 223-233.
85. Ayala, A., M. Muñoz, and S. Argüelles, *Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal*. Oxidative medicine and cellular longevity. 2014; 2014: 360438. 2014, Epub 2014/07/08.
86. Mueller, M.J., *Archetype signals in plants: the phytoprostanes*. Current opinion in plant biology, 2004. **7**(4): p. 441-448.
87. Almérás, E., et al., *Reactive electrophile species activate defense gene expression in Arabidopsis*. The Plant Journal, 2003. **34**(2): p. 205-216.
88. Islam, M.M., et al., *Reactive carbonyl species mediate ABA signaling in guard cells*. Plant and Cell Physiology, 2016. **57**(12): p. 2552-2563.

89. Islam, M.T., et al., *p-Coumaric acid induces jasmonic acid-mediated phenolic accumulation and resistance to black rot disease in Brassica napus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2019. **106**: p. 270-275.
90. Tola, A.J., A. Jaballi, and T.D. Missihoun, *Protein Carbonylation: Emerging Roles in Plant Redox Biology and Future Prospects*. *Plants*, 2021. **10**(7): p. 1451.
91. Møller, I.M., A. Rogowska-Wrzesinska, and R. Rao, *Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective*. *Journal of proteomics*, 2011. **74**(11): p. 2228-2242.
92. Vasilou, V., et al., *Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping*. *Pharmacogenetics*, 1999. **9**(4): p. 421-434.
93. Sophos, N.A., and V. Vasilou, *Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update*. *Chemico-biological interactions*, 2003. **143**: p. 5-22.
94. Perozich, J., et al., *Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family*. *Protein Science*, 1999. **8**(1): p. 137-146.
95. Kotchoni, S.O., et al., *Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in Arabidopsis thaliana confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress*. *Plant, cell & environment*, 2006. **29**(6): p. 1033-1048.
96. Shin, J.-H., S.-R. Kim, and G. An, *Rice aldehyde dehydrogenase7 is needed for seed maturation and viability*. *Plant physiology*, 2009. **149**(2): p. 905-915.
97. Yamauchi, Y., et al., *NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**(9): p. 6999-7009.
98. Pawłowski, T.A., et al., *Plant development reprogramming by cynipid gall wasp: proteomic analysis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2017. **39**(5): p. 1-12.
99. Saini, S.S., et al., *Benzaldehyde dehydrogenase-driven phytoalexin biosynthesis in elicitor-treated Pyrus pyrifolia cell cultures*. *Journal of plant physiology*, 2017. **215**: p. 154-162.
100. Zhang, Y., et al., *Genome-wide identification and analysis of grape aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily*. *PLoS one*, 2012. **7**(2): p. e32153.
101. Guo, J., et al., *Aldehyde dehydrogenase plays crucial roles in response to lower temperature stress in Solanum tuberosum and Nicotiana benthamiana*. *Plant Science*, 2020. **297**: p. 110525.
102. Rasheed, S., et al., *The modulation of acetic acid pathway genes in Arabidopsis improves survival under drought stress*. *Scientific reports*, 2018. **8**(1): p. 1-15.
103. Gautam, R., et al., *Ectopic expression of BrALDH7B2 gene encoding an antiquitin from Brassica rapa confers tolerance to abiotic stresses and improves photosynthetic performance under salt stress in tobacco*. *Environmental and Experimental Botany*, 2020. **180**: p. 104223.
104. Wei, Y., et al., *The roles of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in the PDH bypass of Arabidopsis*. *BMC biochemistry*, 2009. **10**(1): p. 1-10.
105. Kim, J.-M., et al., *Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants*. *Nature Plants*, 2017. **3**(7): p. 1-7.

106. Chen, C., et al., *Cytosolic acetyl-CoA promotes histone acetylation predominantly at H3K27 in Arabidopsis*. *Nature plants*, 2017. 3(10): p. 814-824.
107. Finkel, T., and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. *nature*, 2000. 408(6809): p. 239-247.
108. Hashiguchi, A., and S. Komatsu, *Impact of post-translational modifications of crop proteins under abiotic stress*. *Proteomes*, 2016. 4(4): p. 42.
109. Davies, M.J., *The oxidative environment and protein damage*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2005. 1703(2): p. 93-109.
110. Torta, F., et al., *Proteomic analysis of protein S-nitrosylation*. *Proteomics*, 2008. 8(21): p. 4484-4494.
111. Waszczak, C., et al., *Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction*. *Journal of experimental botany*, 2015. 66(10): p. 2923-2934.
112. Yun, B.-W., et al., *S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity*. *Nature*, 2011. 478(7368): p. 264-268.
113. Di Simplicio, P., et al., *Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells*. *Amino acids*, 2003. 25(3): p. 323-339.
114. Liu, J., et al., *Structural characterizations of human periostin dimerization and cysteinyltation*. *FEBS letters*, 2018. 592(11): p. 1789-1803.
115. Hochgrafe, F., et al., *S-cysteinyltation is a general mechanism for thiol protection of *Bacillus subtilis* proteins after oxidative stress*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. 282(36): p. 25981-25985.
116. Hochgräfe, F., et al., *Fluorescence thiol modification assay: oxidatively modified proteins in *Bacillus subtilis**. *Molecular microbiology*, 2005. 58(2): p. 409-425.
117. Weber, H., et al., *Oxidative stress triggers thiol oxidation in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Staphylococcus aureus**. *Molecular microbiology*, 2004. 52(1): p. 133-140.
118. Gao, X.-H., et al., *Methods for analysis of protein glutathionylation and their application to photosynthetic organisms*. *Molecular Plant*, 2009. 2(2): p. 218-235.
119. Filipovic, M.R., *Persulfidation (S-sulfhydration) and H<sub>2</sub>S*. *Chemistry, biochemistry and pharmacology of hydrogen sulfide*, 2015: p. 29-59.
120. Aroca, Á., et al., *S-sulfhydration: a cysteine posttranslational modification in plant systems*. *Plant Physiology*, 2015. 168(1): p. 334-342.
121. Mustafa, A.K., et al., *H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulfhydration*. *Science signaling*, 2009. 2(96): p. ra72-ra72.
122. Zivanovic, J., et al., *Selective persulfide detection reveals evolutionarily conserved antiaging effects of S-sulfhydration*. *Cell metabolism*, 2019. 30(6): p. 1152-1170. e13.
123. Aroca, A., C. Gotor, and L.C. Romero, *Hydrogen sulfide signaling in plants: emerging roles of protein persulfidation*. *Frontiers in Plant Science*, 2018: p. 1369.
124. Filipovic, M.R., et al., *Chemical biology of H<sub>2</sub>S signaling through persulfidation*. *Chemical reviews*, 2018. 118(3): p. 1253-1337.
125. Shen, J., et al., *Persulfidation-based modification of cysteine desulfhydrase and the NADPH oxidase RBOHD controls guard cell abscisic acid signaling*. *The Plant Cell*, 2020. 32(4): p. 1000-1017.

126. Schöneich, C., et al., *Iron-thiolate induced oxidation of methionine to methionine sulfoxide in small model peptides. Intramolecular catalysis by histidine*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1993. **1158**(3): p. 307-322.
127. Berlett, B.S., R.L. Levine, and E.R. Stadtman, *Carbon dioxide stimulates peroxy nitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylylation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(6): p. 2784-2789.
128. Sigalov, A.B., and L.J. Stern, *Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I*. *FEBS letters*, 1998. **433**(3): p. 196-200.
129. Brot, N., and H. Weissbach, *Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1983. **223**(1): p. 271-281.
130. Vogt, W., *Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995. **18**(1): p. 93-105.
131. Stadtman, E.R., J. Moskovitz, and R.L. Levine, *Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences*. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2003. **5**(5): p. 577-582.
132. Levine, R.L., et al., *Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(26): p. 15036-15040.
133. Stadtman, E.R., *Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1990. **9**(4): p. 315-325.
134. Höhn, A., J. König, and T. Grune, *Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins*. *Journal of proteomics*, 2013. **92**: p. 132-159.
135. Berlett, B.S., and E.R. Stadtman, *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(33): p. 20313-20316.
136. Matamoros, M.A., et al., *Mitochondria are an early target of oxidative modifications in senescent legume nodules*. *New Phytologist*, 2013. **197**(3): p. 873-885.
137. Sun, C., et al., *Nitrate reductase-mediated early nitric oxide burst alleviates oxidative damage induced by aluminum through enhancement of antioxidant defenses in roots of wheat (*Triticum aestivum*)*. *New phytologist*, 2014. **201**(4): p. 1240-1250.
138. Colombo, G., et al., *A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples*. *Journal of Chromatography B*, 2016. **1019**: p. 178-190.
139. Wong, C.M., et al., *Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling*. *Circulation research*, 2008. **102**(3): p. 310-318.
140. Estévez, M., S. Díaz-Velasco, and R. Martínez, *Protein carbonylation in food and nutrition: a concise update*. *Amino Acids*, 2022. **54**(4): p. 559-573.
141. Taylor, S.W., et al., *Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(22): p. 19587-19590.

142. Todorovski, T., et al., *Synthesis of peptides containing 5-hydroxytryptophan, oxindolylalanine, N-formylkynurenone and kynurenone*. Journal of Peptide Science, 2011. **17**(4): p. 256-262.
143. Madian, A.G, and F.E. Regnier, *Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites*. Journal of proteome research, 2010. **9**(8): p. 3766-3780.
144. Akagawa, M., *Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches*. Free Radical Research, 2021. **55**(4): p. 307-320.
145. Ahmed, N., et al., *Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nε-carboxymethyl-lysine-and Nε-(1-carboxyethyl) lysine-modified albumin*. Biochemical Journal, 2002. **364**(1): p. 1-14.
146. Ulrich, P, and A. Cerami, *Protein glycation, diabetes, and aging*. Recent progress in hormone research, 2001. **56**(1): p. 1-22.
147. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress*. Clinica chimica acta, 2003. **329**(1-2): p. 23-38.
148. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression*. Journal of cellular and molecular medicine, 2006. **10**(2): p. 389-406.
149. Biswas, S., A.S. Chida, and I. Rahman, *Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling*. Biochemical pharmacology, 2006. **71**(5): p. 551-564.
150. Doria, E., et al., *Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2012. **2012**.
151. Levine, R.L, and E.R. Stadtman, *Oxidative modification of proteins during aging*. Experimental gerontology, 2001. **36**(9): p. 1495-1502.
152. Touati, D., *Iron and oxidative stress in bacteria*. Archives of biochemistry and biophysics, 2000. **373**(1): p. 1-6.
153. Fuangthong, M., et al., *Regulation of the *Bacillus subtilis* fur and perR genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible*. Journal of bacteriology, 2002. **184**(12): p. 3276-3286.
154. Helmann, J.D., et al., *The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors*. Journal of Bacteriology, 2003. **185**(1): p. 243-253.
155. Fuangthong, M, and J.D. Helmann, *Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis**. Journal of bacteriology, 2003. **185**(21): p. 6348-6357.
156. Faulkner, M.J, and J.D. Helmann, *Peroxide stress elicits adaptive changes in bacterial metal ion homeostasis*. Antioxidants & redox signaling, 2011. **15**(1): p. 175-189.
157. Lee, J.-W, and J.D. Helmann, *The PerR transcription factor senses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by metal-catalysed histidine oxidation*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 363-367.
158. Linzner, N., et al., *Thiol-based redox switches in the major pathogen *Staphylococcus aureus**. Biological Chemistry, 2021. **402**(3): p. 333-361.

159. Hillion, M, and H. Antelmann, *Thiol-based redox switches in prokaryotes*. *Biological chemistry*, 2015. **396**(5): p. 415-444.
160. Zhu, H., et al., *Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: regulation by Nrf2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress*. *Experimental biology and medicine*, 2008. **233**(4): p. 463-474.
161. McMahon, M., et al., *Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(24): p. 21592-21600.
162. Levonen, A.-L., et al., *Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products*. *Biochemical Journal*, 2004. **378**(2): p. 373-382.
163. McMahon, M., et al., *Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(44): p. 18838-18843.
164. Bluher, M., et al., *Activated Ask1-MKK4-p38MAPK/JNK stress signaling pathway in human omental fat tissue may link macrophage infiltration to whole-body Insulin sensitivity*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2009. **94**(7): p. 2507-2515.
165. Yu, Y, and D.R. Richardson, *Cellular iron depletion stimulates the JNK and p38 MAPK signaling transduction pathways, dissociation of ASK1-thioredoxin, and activation of ASK1*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**(17): p. 15413-15427.
166. Fujino, G., et al., *Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1*. *Molecular and cellular biology*, 2007. **27**(23): p. 8152-8163.
167. Curtis, J.M., et al., *Protein carbonylation and metabolic control systems*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2012. **23**(8): p. 399-406.
168. Apel, K, and H. Hirt, *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2004. **55**: p. 373-399.
169. Wojtaszek, P., *Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection*. *Biochemical Journal*, 1997. **322**(3): p. 681-692.
170. Oracz, K., et al., *ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation*. *The Plant Journal*, 2007. **50**(3): p. 452-465.
171. Xiong, Y., et al., *Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis**. *Plant physiology*, 2007. **143**(1): p. 291-299.
172. Tanou, G., et al., *Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity*. *The Plant Journal*, 2009. **60**(5): p. 795-804.
173. Moran, J.F., et al., *Drought induces oxidative stress in pea plants*. *Planta*, 1994. **194**(3): p. 346-352.

174. Bai, X., et al., *Nitric oxide enhances desiccation tolerance of recalcitrant *Antiaris toxicaria* seeds via protein S-nitrosylation and carbonylation*. PLoS One, 2011. 6(6): p. e20714.
175. Qiu, Q.-S., et al., *Increased protein carbonylation in leaves of *Arabidopsis* and soybean in response to elevated [CO<sub>2</sub>]*. Photosynthesis Research, 2008. 97(2): p. 155-166.
176. Nguyen, A., and R. Donaldson, *Metal-catalyzed oxidation induces carbonylation of peroxisomal proteins and loss of enzymatic activities*. Archives of biochemistry and biophysics, 2005. 439(1): p. 25-31.
177. Kristensen, B.K., et al., *Identification of oxidised proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Phytochemistry, 2004. 65(12): p. 1839-1851.
178. Romero-Puertas, M., et al., *Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants*. Plant, Cell & Environment, 2002. 25(5): p. 677-686.
179. Sandalio, L., et al., *Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants*. Journal of experimental botany, 2001. 52(364): p. 2115-2126.
180. Johansson, E., O. Olsson, and T. Nyström, *Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana**. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(21): p. 22204-22208.
181. Job, C., et al., *Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination*. Plant Physiology, 2005. 138(2): p. 790-802.
182. Rajjou, L., et al., *Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols*. Plant physiology, 2008. 148(1): p. 620-641.
183. Qin, G., et al., *Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: a redox proteomics analysis*. Journal of proteome research, 2009. 8(5): p. 2449-2462.
184. Krasuska, U., et al., *Dormancy alleviation by NO or HCN leading to decline of protein carbonylation levels in apple (*Malus domestica* Borkh.) embryos*. Journal of Plant Physiology, 2014. 171(13): p. 1132-1141.
185. Dębska, K., et al., *Dormancy removal of apple seeds by cold stratification is associated with fluctuation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO production and protein carbonylation level*. Journal of plant physiology, 2013. 170(5): p. 480-488.
186. Islam, M.M., et al., *Reactive carbonyl species function as signal mediators downstream of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and regulate [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> elevation in ABA signal pathway in *Arabidopsis* guard cells*. Plant and Cell Physiology, 2019. 60(5): p. 1146-1159.
187. Suhita, D., et al., *Cytoplasmic alkalinization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate-and abscisic acid-induced stomatal closure*. Plant physiology, 2004. 134(4): p. 1536-1545.
188. Islam, M.M., et al., *Cytosolic alkalinization and cytosolic calcium oscillation in *Arabidopsis* guard cells response to ABA and MeJA*. Plant and Cell Physiology, 2010. 51(10): p. 1721-1730.

189. Islam, M.M., et al., *Reactive carbonyl species mediate methyl jasmonate-induced stomatal closure*. Plant and Cell Physiology, 2020. 61(10): p. 1788-1797.
190. Akter, N., et al., *Effects of depletion of glutathione on abscisic acid-and methyl jasmonate-induced stomatal closure in Arabidopsis thaliana*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2012: p. 120384.
191. Akter, N., et al., *Negative regulation of methyl jasmonate-induced stomatal closure by glutathione in Arabidopsis*. Journal of plant growth regulation, 2013. 32(1): p. 208-215.
192. McAinsh, M.R., C. Brownlee, and A.M. Hetherington, *Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca<sup>2+</sup> precedes stomatal closure*. Nature, 1990. 343(6254): p. 186-188.
193. McAinsh, M.R., C. Brownlee, and A.M. Hetherington, *Visualizing changes in cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> during the response of stomatal guard cells to abscisic acid*. The Plant Cell, 1992. 4(9): p. 1113-1122.
194. Staxén, I., et al., *Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. 96(4): p. 1779-1784.
195. Murata, Y., et al., *Abscisic acid activation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channels in guard cells requires cytosolic NAD (P) H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in abi1-1 and abi2-1 protein phosphatase 2C mutants*. The Plant Cell, 2001. 13(11): p. 2513-2523.
196. Davies, K.J., *Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome*. Biochimie, 2001. 83(3-4): p. 301-310.
197. Polge, C., et al., *Evidence for the existence in Arabidopsis thaliana of the proteasome proteolytic pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2009. 284(51): p. 35412-35424.
198. Kästle, M. and T. Grune, *Proteins bearing oxidation-induced carbonyl groups are not preferentially ubiquitinated*. Biochimie, 2011. 93(6): p. 1076-1079.
199. Rigas, S., et al., *The multifaceted role of Lon proteolysis in seedling establishment and maintenance of plant organelle function: living from protein destruction*. Physiologia plantarum, 2012. 145(1): p. 215-223.
200. Gibala, M., et al., *The lack of mitochondrial AtFtsH4 protease alters Arabidopsis leaf morphology at the late stage of rosette development under short-day photoperiod*. The Plant Journal, 2009. 59(5): p. 685-699.
201. Nyström, T., *Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence*. The EMBO journal, 2005. 24(7): p. 1311-1317.
202. Araújo, W.L., et al., *Protein degradation—an alternative respiratory substrate for stressed plants*. Trends in plant science, 2011. 16(9): p. 489-498.
203. Møller, I.M. and L.J. Sweetlove, *ROS signalling—specificity is required*. Trends in plant science, 2010. 15(7): p. 370-374.
204. Hsu, C.-N. and Y.-L. Tain, *Developmental origins of kidney disease: why oxidative stress matters?* Antioxidants, 2020. 10(1): p. 33.
205. Sergiev, I., V. Alexieva, and E. Karanov, *Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants*. Compt Rend Acad Bulg Sci, 1997. 51(3): p. 121-124.

206. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. 72(1-2): p. 248-254.
207. Levine, R., *Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins*. Methods. Enzymol., 1994. 233: p. 246-257.
208. LAEMMLI, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. nature, 1970. 227(5259): p. 680-685.
209. Yoshida, T., et al., *The role of abscisic acid signaling in maintaining the metabolic balance required for *Arabidopsis* growth under nonstress conditions*. The Plant Cell, 2019. 31(1): p. 84-105.
210. Leshem, Y., et al., *Reduced expression of the v-SNAREs AtVAMP71/AtVAMP7C gene family in *Arabidopsis* reduces drought tolerance by suppression of abscisic acid-dependent stomatal closure*. Journal of experimental botany, 2010. 61(10): p. 2615-2622.
211. Watkins, J.M., P.J. Hechler, and G.K. Muday, *Ethylene-induced flavonol accumulation in guard cells suppresses reactive oxygen species and moderates stomatal aperture*. Plant Physiology, 2014. 164(4): p. 1707-1717.
212. Fedorova, M., *Diversity of Protein Carbonylation Pathways: Direct Oxidation, Glycoxidation, and Modifications by Lipid Peroxidation Products*. Protein Carbonylation: Principles, Analysis, and Biological Implications, 2017: p. 48-82.
213. Matamoros, M.A., et al., *Protein carbonylation and glycation in legume nodules*. Plant Physiology, 2018. 177(4): p. 1510-1528.
214. Chavez, J., et al., *New role for an old probe: affinity labeling of oxylipid protein conjugates by N'-Aminooxymethylcarbonylhydrazino d-biotin*. Analytical Chemistry, 2006. 78(19): p. 6847-6854.
215. Tzeng, S.-C, and C.S. Maier, *Label-free proteomics assisted by affinity enrichment for elucidating the chemical reactivity of the liver mitochondrial proteome toward adduction by the lipid electrophile 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)*. Frontiers in Chemistry, 2016. 4: p. 2.
216. Ge, S.X., D. Jung, and R. Yao, *ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants*. Bioinformatics, 2020. 36(8): p. 2628-2629.
217. Hooper, C.M., et al., *SUBA4: the interactive data analysis centre for *Arabidopsis* subcellular protein locations*. Nucleic acids research, 2017. 45(D1): p. D1064-D1074.
218. Grimsrud, P.A., et al., *Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes*. Journal of Biological Chemistry, 2008. 283(32): p. 21837-21841.
219. Levine, R.L., et al., *Determination of carbonyl groups in oxidized proteins*. Stress response, 2000: p. 15-24.
220. Baraibar, M.A., R. Ladouce, and B. Friguet, *Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging*. Journal of proteomics, 2013. 92: p. 63-70.
221. Lounifi, I., et al., *Interplay between protein carbonylation and nitrosylation in plants*. Proteomics, 2013. 13(3-4): p. 568-578.

222. Weber, H., et al., *Selective and powerful stress gene expression in Arabidopsis in response to malondialdehyde*. The Plant Journal, 2004. 37(6): p. 877-888.
223. Sattler, S.E., et al., *Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in Arabidopsis tocopherol-deficient mutants*. The Plant Cell, 2006. 18(12): p. 3706-3720.
224. BARBA-ESPÍN, G., et al., *Understanding the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach*. Plant, Cell & Environment, 2011. 34(11): p. 1907-1919.
225. Tanou, G., et al., *Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress*. The Plant Journal, 2012. 72(4): p. 585-599.
226. Job, C., and C. Bailly, *Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination*. Frontiers in plant science, 2013. 4: p. 77.
227. Sultan, C.S., et al., *Impact of carbonylation on glutathione peroxidase-1 activity in human hyperglycemic endothelial cells*. Redox biology, 2018. 16: p. 113-122.
228. Jander, G., and V. Joshi, *Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants*. Molecular plant, 2010. 3(1): p. 54-65.
229. Kong, D., et al., *L-Met activates Arabidopsis GLR Ca<sup>2+</sup> channels upstream of ROS production and regulates stomatal movement*. Cell Reports, 2016. 17(10): p. 2553-2561.
230. Ravanel, S., et al., *The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. 95(13): p. 7805-7812.
231. Chiba, Y., et al., *S-adenosyl-L-methionine is an effector in the posttranscriptional autoregulation of the cystathione  $\gamma$ -synthase gene in Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. 100(18): p. 10225-10230.
232. Tagnon, M.D., and K.O. Simeon, *Aldehyde dehydrogenases may modulate signaling by lipid peroxidation-derived bioactive aldehydes*. Plant Signaling & Behavior, 2017. 12(11): p. e1387707.
233. Skirycz, A., et al., *Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress*. Plant physiology, 2010. 152(1): p. 226-244.
234. Claeys, H., et al., *What is stress? Dose-response effects in commonly used in vitro stress assays*. Plant physiology, 2014. 165(2): p. 519-527.
235. Missihoun, T.D., et al., *Overexpression of ALDH10A8 and ALDH10A9 genes provides insight into their role in glycine betaine synthesis and affects primary metabolism in Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology, 2015. 56(9): p. 1798-1807.
236. Nikonorova, N., et al., *Early mannitol-triggered changes in the Arabidopsis leaf (phospho) proteome reveal growth regulators*. Journal of experimental botany, 2018. 69(19): p. 4591-4607.
237. Skirycz, A., et al., *A reciprocal <sup>15</sup>N-labeling proteomic analysis of expanding Arabidopsis leaves subjected to osmotic stress indicates importance of mitochondria in preserving plastid functions*. Journal of proteome research, 2011. 10(3): p. 1018-1029.

238. Skirycz, A., et al., *Survival and growth of *Arabidopsis* plants given limited water are not equal*. *Nature biotechnology*, 2011. **29**(3): p. 212-214.
239. Dubois, M, and D. Inzé, *Plant growth under suboptimal water conditions: early responses and methods to study them*. *Journal of Experimental Botany*, 2020. **71**(5): p. 1706-1722.
240. Neumann, C.A., J. Cao, and Y. Manevich, *Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling*. *Cell cycle*, 2009. **8**(24): p. 4072-4078.
241. Parmigiani, R., et al., *HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(28): p. 9633-9638.
242. Millar, A.A., et al., *Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase*. *The Plant Journal*, 2006. **45**(6): p. 942-954.
243. Seo, M., et al., *Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism*. *The Plant Journal*, 2006. **48**(3): p. 354-366.
244. Koshimizu, K., et al., *Identity of lupin inhibitor with abscisin II and its biological activity on growth of rice seedlings*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1966. **30**(9): p. 941-943.
245. Zeevaart, J., *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*. eds. Hooykaas PJJ, Hall MA, and Libbenga KR, Elsevier Science, Amsterdam, 1999: p. 189-207.
246. Sauter, A., K.J. Dietz, and W. Hartung, *A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling*. *Plant, Cell & Environment*, 2002. **25**(2): p. 223-228.
247. Ross, J., and D. O'Neill, *New interactions between classical plant hormones*. *Trends in plant science*, 2001. **6**(1): p. 2-4.
248. Lim, E.-K., et al., *Resolution of (+)-abscisic acid using an *Arabidopsis* glycosyltransferase*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005. **16**(1): p. 143-147.
249. Bowles, D., et al., *Glycosyltransferases of lipophilic small molecules*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2006. **57**: p. 567-597.
250. von Saint Paul, V., et al., *The *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence*. *The Plant Cell*, 2011. **23**(11): p. 4124-4145.
251. Winger, A.M., et al., *The cytotoxic lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal covalently modifies a selective range of proteins linked to respiratory function in plant mitochondria*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(52): p. 37436-37447.
252. Milic, I., et al., *Separation and characterization of oxidized isomeric lipid-peptide adducts by ion mobility mass spectrometry*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2015. **50**(12): p. 1386-1392.
253. Chen, Y., et al., *Quantitative profiling of protein carbonylations in ferroptosis by an aniline-derived probe*. *Journal of the American Chemical Society*, 2018. **140**(13): p. 4712-4720.

254. Poganik, J.R., M.J. Long, and Y. Aye, *Getting the message? Native reactive electrophiles pass two out of three thresholds to be bona fide signaling mediators.* Bioessays, 2018. 40(5): p. 1700240.
255. Durbin, K.R., et al., *Quantitation and identification of thousands of human proteoforms below 30 kDa.* Journal of proteome research, 2016. 15(3): p. 976-982.