

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

IMPORTANCE DE LA CARBONYLATION DES PROTÉINES DANS LA
TRANSDUCTION DU SIGNAL INTRACELLULAIRE DES ESPÈCES RÉACTIVES
DE L'OXYGÈNE CHEZ LES PLANTES

THÈSE PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU
DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
GEORGES YANNICK FANGUE YAPSEU

Février 2026

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (PH. D.)

Direction de recherche :

Tagnon D. Missihoun Directeur de recherche

Isabel Desgagné-Penix Codirectrice de recherche

Jury d'évaluation de la thèse :

Tagnon D. Missihoun Directeur de recherche

Isabel Desgagné-Penix Codirectrice de recherche

Vincent Maire Président du jury

Vincent Maire Évaluateur interne

Steve Bourgault Évaluateur externe

Dominique Michaud Évaluateur externe

Thèse soutenue le 27 novembre 2025

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.

La gardienne et les marques du temps

La redoutable et discrète gardienne,
Dans la cellule, veille sans peine.
Ses deux bras, liées par le destin,
Forment un pont contre le mal divin.

Face aux peroxydes, elle s'élance,
Elle neutralise leur danse en silence.
Cycle redox, ballet moléculaire,
Elle se réincarne, insatiable volontaire.

Oxydée, elle se transforme,
Sous la thiorédoxine, elle se reforme.
Signal cellulaire ou stress fatal,
Toujours, elle choisit la voie vitale.

Protectrice des voies métaboliques,
Elle guide les flux énergétiques.
Et dans l'ombre des réactions fines,
Brille la force de ses deux cystéines.

Mais, dans le souffle rouge de l'oxydation,
Naît une empreinte, une modification.
La 2-CysPrx, jadis fidèle,
Porte des marques, invisibles mais réelles.

Les carbonyles surgissent, l'envahissent,
Altèrent ses fonctions, la désorganise.
Histidine, lysine, cystéine, cibles désignés,
Par les aldéhydes, ils sont marqués.

Aucune sœur ne peut la réparer,
Aucun retour possible, elle est altérée.
La carbonylation l'étreint, signal du déclin,
Vieillessement inscrit dans son destin.

Dans ce chaos moléculaire,
La 2-CysPrx se dirige vers la lumière.
Protéasome ou autophagie,
Elle s'efface dans cette tragédie.

Georges Fangué

DÉDICACES

Je dédie ce travail à ces personnes qui me sont chères :

Mes parents : Benjamin Fangué & Germaine Moumi Ngakoué

Mes sœurs : Eugénie, Ginette et Grâce

Mes fils : Shalom et Owen

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à l'Éternel. Seigneur, ta grâce me protège et me guide. À toi soient le règne, la puissance et la gloire !

J'adresse mes plus grands remerciements au Pr Tagnon D. Missihoun, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour n'avoir ménagé aucun effort dans mon encadrement. Il m'a témoigné une très grande confiance, a su me guider, m'encourager et me motiver tout au long de ces années de thèse.

Je tiens également à remercier la Pre Isabel Desgagné-Penix, pour avoir accepté de codiriger mon travail de thèse. Elle a été mon garde-fou et a su me préserver de tous ces maux qui privent les jeunes chercheurs de toute volonté (anxiété, procrastination, syndrome de l'imposteur, etc.) en m'écoutant, en m'encourageant et en me prodiguant des conseils aussi bien sur les plans scientifique et professionnel que sur le plan personnel.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du jury qui ont accepté d'examiner avec attention mon travail de thèse.

Mes remerciements vont également à l'endroit de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR) pour son soutien financier, technologique et administratif via sa fondation, ses laboratoires et son personnel.

J'adresse un grand merci à tous les membres passés ou présents du labo avec qui j'ai partagé des moments mémorables : Dr Tola A. Julius, Naresh Pannerselvam, Amal Jaballi, Marina N. Mouliom, Michel G. Dagbozoukou, Hela Baccouche, Mariana Elizabeth Martinez Cabanillas et mes deux stagiaires, Maria Rua Fontalvo et Mariana Moncada de la Fuente.

Je remercie également tous les étudiants, les techniciens de laboratoire, les professionnels de recherche et les enseignants du groupe de recherche en biologie végétale (GRBV) de l'UQTR pour tous les moments d'échanges scientifiques et personnelles qui ont animé ma vie d'étudiant au doctorat. Une mention spéciale pour Dre Natacha Merindol,

Dre Fatma Meddeb, Dr Serge B. Nouemsi, Mélodie B. Plourde, Pr Hugo Germain et Pr Vincent Maire pour leurs précieux conseils.

Je tiens également à remercier les personnes qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce projet. J'ai une pensée pour le Pr Francisco Javier Cejudo Fernandez (IBVF, Espagne) qui m'a fourni les graines d'*Arabidopsis thaliana* double mutants pour les gènes de la peroxirédoxine, le Pr Pascal Rey (CNRS, France) qui m'a fourni l'anticorps anti-2-Cys peroxirédoxine, les techniciens du laboratoire central de l'UQTR à savoir Vicky Beaupré, Jean-Philippe Poirier et Francis Lafontaine pour m'avoir formé sur l'utilisation de la HPLC et du spectrophotomètre à fluorescence Cary Eclipse.

RÉSUMÉ

Cette thèse examine l'impact de la carbonylation des protéines, une modification post-traductionnelle non enzymatique et irréversible pouvant affecter la structure et l'activité des protéines, dans le mécanisme de la transduction du signal intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) chez les plantes. Dans la première partie, nous avons procédé à l'identification des protéines sensibles à la carbonylation en réponse au H₂O₂. À cet effet, les semis d'*Arabidopsis thaliana* âgés de 14 jours ont été traités avec du H₂O₂ par pulvérisation foliaire, et 1 h après le traitement, les protéines carbonylées ont été enrichies au niveau des peptides, puis analysées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Nous avons ainsi identifié 35 protéines spécifiquement carbonylées dans les feuilles d'*A. thaliana* en réponse au H₂O₂ exogène, et l'analyse d'enrichissement de l'ontologie des gènes a montré que la plupart de ces protéines sont impliquées dans la réponse de défense, la réponse du système immunitaire et la réponse à un stimulus externe, suggérant ainsi que la carbonylation intervient dans les voies de signalisation cellulaire. Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons évalué *in vitro* l'impact de la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine, des dérivés carbonylés réactifs agissant en aval du H₂O₂, sur la structure, la stabilité et l'activité de la 2-Cys peroxyrédoxine (2-CysPrx ou 2cp) d'*A. thaliana*. L'identification de cette peroxydase thiol-dépendante parmi les protéines sensibles à la carbonylation en réponse au H₂O₂ nous en effet a amené à interroger l'impact de sa carbonylation dans la régulation du mécanisme redox chez les plantes. Les gènes de la 2cpA et de la 2cpB ont été isolés des feuilles d'*A. thaliana*, clonés dans le plasmide pET28a, puis exprimés dans la souche bactérienne *Escherichia coli* BL21. Les protéines recombinantes ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur Ni-NTA et finalement carbonylées avec le 2-hexenal et l'acroléine pour les analyses de spectrofluorimétrie, de diffusion dynamique de la lumière et de LC-MS/MS. Nos résultats montrent que la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine provoque des changements significatifs dans la conformation native, la distribution de la taille et le comportement d'agrégation de la 2cpA et de la 2cpB. Malgré ces altérations structurales, les protéines exécutent tout de même des activités enzymatiques, mais avec une efficacité et une vitesse catalytique plus faible, en comparaison aux protéines natives. Par ailleurs, elles exécutent également des activités chaperonnes et antioxydantes, montrant ainsi

qu'elles sont résistantes à la désactivation de leurs thiols avec le 2-hexenal et l'acroléine. Cependant, la carbonylation avec le 2-hexenal augmente la vitesse de dégradation par le protéasome de la 2cpA et de la 2cpB, suggérant ainsi que cette modification joue un rôle important dans l'homéostasie des protéines. Les résultats de cette thèse montrent que le H₂O₂ exogène module le schéma de la carbonylation des protéines dans les feuilles d'*A. thaliana*, et que la carbonylation de la 2-CysPrx fait partie intégrante des processus cellulaires, en particulier en réponse au stress oxydatif. Ainsi, les travaux reportés dans cette thèse suggèrent que la carbonylation joue un rôle important dans les processus physiologiques normaux chez les plantes, ce qui met en évidence la complexité de son impact sur la stabilité et la fonction des protéines. Nos travaux peuvent ainsi servir dans l'orientation d'une approche ciblée dans les futures recherches sur l'utilisation par les plantes du mécanisme de la carbonylation des protéines en réponse au stress oxydatif.

Mots clés : Peroxyde d'hydrogène, dérivés carbonyles réactifs, carbonylation des protéines, réaction de défense des plantes, 2-Cys peroxirédoxine, stress oxydatif.

TABLES DE MATIÈRES

DÉDICACES	i
REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES	xiv

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1. La perception du stress chez les plantes	1
1.2. Les espèces réactives de l'oxygène.....	1
1.2.1. Origine des espèces réactives de l'oxygène.....	1
1.2.2. Réactivité des ERO	3
1.2.3. Rôle des ERO dans la signalisation redox et le stress oxydatif	5
1.2.4. Les peroxydases thiols, messagers dans la signalisation cellulaire redox	9
1.2.5. Les RCS : messagers dans la signalisation cellulaire	14
1.2.5.1 Origine et propriétés physico-chimiques des RCS	15
1.2.5.2 Mécanisme d'action : la carbonylation comme interrupteur moléculaire.....	15
1.3. La carbonylation des protéines : rôle dans la signalisation du H ₂ O ₂	16
1.3.1. Aspect général de la carbonylation des protéines	16
1.3.2. Chimie de la carbonylation des protéines	18
1.3.3. Approche analytique pour la détermination des protéines carbonylées.....	20
1.3.4. Importance de la carbonylation des protéines dans la signalisation des ERO..	23
1.4. Problématique	25
1.5. Hypothèse et objectifs de la thèse.....	27
1.5.1. Hypothèse	27
1.5.2. Objectifs.....	27
1.5.2.1. Objectif général.....	27
1.5.2.2. Objectifs spécifiques.....	28
1.6. Références.....	28

CHAPITRE II

PROTEOME-WIDE ANALYSIS OF HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED PROTEIN CARBOXYLATION IN <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.1. Author contributions	35
2.2. Résumé.....	35
2.3. Abstract	36
2.4. Introduction.....	37
2.5. Material and methods.....	39
2.5.1. Plants and growth conditions	39
2.5.2. Treatments.....	39
2.5.3. Protein extraction and labelling	39
2.5.4. In-gel analysis of carbonylated proteins	40
2.5.5. Protein carbonyl enrichment for LC-MS/MS analysis	40
2.5.6. LC-MS/MS analysis and database searching.....	42
2.5.7. Determination of malondialdehyde content and catalase enzymatic activity ...	43
2.5.8. Statistical analysis.....	43
2.6. Results.....	43
2.6.1. SDS-PAGE analysis of H ₂ O ₂ -induced protein carbonylation.....	43
2.6.2. Detection of H ₂ O ₂ -induced carbonylated proteins by LC-MS/MS.....	46
2.6.3. Exogenous H ₂ O ₂ mostly targets proteins involved in defense-related p	58
2.6.4. H ₂ O ₂ -induced protein carbonylation targets the interaction between proteins .	60
2.7. Discussion	61
2.8. Data availability statement.....	64
2.9. Funding	64
2.10. Acknowledgments.....	64
2.11. Conflict of interest	64
2.12. Publisher's note.....	65
2.13. References.....	65
2.14. Supplementary material	69
2.14.1. Supplementary figures	69
2.14.2. Supplementary tables	72
CHAPITRE III	
IMPACT DE LA CARBOXYLATION SUR LA STRUCTURE ET L'ACTIVITÉ DE LA 2-CYS PEROXIREDOXINE.....	109

3.1.	Contribution des auteurs	109
3.2.	Abstract	109
3.3.	Résumé.....	110
3.4.	Introduction.....	112
3.5.	Matériel et méthodes.....	114
3.5.1.	Analyse <i>in silico</i> de l'impact de la carbonylation	114
3.5.1.1.	Amarrage moléculaire.....	114
3.5.1.2.	Simulation moléculaire dynamique	115
3.5.2.	Analyse <i>in vitro</i> de l'impact de la carbonylation.....	116
3.5.2.1.	Expression hétérologue de la 2cpA et de la 2cpB.....	116
3.5.2.2.	Production et purification des protéines recombinantes	117
3.5.2.3.	Analyse western blot.....	117
3.5.2.4.	Carbonylation des protéines avec le 2-hexenal et l'acroléine.....	118
3.5.2.5.	Analyse de la conformation native des protéines carbonylées	118
3.5.2.6.	Analyse de la distribution de la taille des protéines carbonylées.....	119
3.5.2.7.	Analyse de l'activité enzymatique des protéines carbonylées	120
3.5.2.8.	Analyse de la sensibilité des cystéines à la carbonylation.....	120
3.5.2.9.	Analyse de l'activité chaperonne et antioxydante	121
3.5.2.10.	Évaluation de la dégradation des protéines carbonylées par le protéasome	121
3.5.2.11.	Analyses statistiques	122
3.6.	Résultats	122
3.6.1.	Les résidus Cys119, Cys241 et His208 sont des cibles	122
3.6.2.	Le 2-hexenal et l'acroléine carbonylent <i>in vitro</i> la 2cpA et la 2cpB.....	128
3.6.3.	Les thiols de la 2-CysPrx sont des cibles <i>in vitro</i> du 2-hexenal et de l'acr	130
3.6.4.	La carbonylation affecte <i>in silico</i> la stabilité de la 2-CysPrx	132
3.6.4.1.	Simulation moléculaire dynamique avec le monomère	132
3.6.4.2.	Simulation moléculaire dynamique avec le dimère	135
3.6.5.	La spectrofluorimétrie valide des changements de la conformation native....	139
3.6.6.	La carbonylation affecte la distribution de la taille de la 2-CysPrx.....	141
3.6.7.	La carbonylation affecte la capacité d'agrégation de la 2-CysPrx.....	144
3.6.8.	La carbonylation n'entraîne pas la formation d'amyloïdes de la 2-CysPrx....	147
3.6.9.	La carbonylation affecte la stabilité thermique de la 2-CysPrx	148
3.6.10.	La carbonylation réduit la capacité enzymatique de la 2-CysPrx.....	150

3.6.11.	La carbonylation n'inhibe pas l'activité chaperonne et antioxydante	157
3.6.12.	La carbonylation avec le 2-hexenal accroît la sensibilité au protéasome	161
3.7.	Discussion.....	162
3.8.	Financement.....	170
3.9.	Remerciements.....	171
3.10.	Conflit d'intérêt.....	171
3.11.	Références.....	171

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE		178
4.1.	Discussion générale	178
4.1.1.	Le schéma de carbonylation des protéines dépend du signal perçu.....	178
4.1.2.	La carbonylation des protéines joue un rôle crucial dans la transduction	180
4.2.	Conclusion générale.....	182
4.3.	Perspectives.....	184
4.4.	Références.....	186

ANNEXES

Annexe A :	Stratégie opérationnelle utilisée pour l'objectif spécifique 1	a
Annexe B :	La carbonylation des protéines dans les feuilles d' <i>A. thaliana</i>	b
Annexe C :	Le traitement des semis d' <i>A. thaliana</i> avec le H ₂ O ₂ -exogène	d
Annexe D :	Mini-métanalyse des travaux effectués dans notre équipe de recherche.....	e
Annexe E :	Résumé de la méthodologie utilisée pour l'analyse <i>in silico</i>	f
Annexe F :	Importance du DTT dans la préparation des échantillons de protéines	g
Annexe G :	Exemple de résultats de l'analyse de l'effet de la carbonylation	h
Annexe H :	Analyse de l'effet du H ₂ O ₂ -priming sur le profil de carbonylation.....	i
Annexe I :	Impact de la concentration d'aldéhydes sur l'activité enzymatique	k
Annexe J :	Liste des modifications identifiés sur le protéome carbonylé.....	m

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre II

Table 2. 1. Examples of carbonylated proteins identified only in the control plant samples	47
Table 2. 2. Examples of carbonylated proteins identified only in H ₂ O ₂ -treated plant samples.....	52
Table S2. 1. Carbonylated proteins identified in the three replicates of the control samples	72
Table S2. 2. Carbonylated proteins identified in the three replicates of H ₂ O ₂ -treated samples.....	90
Table S2. 3. Carbonylated proteins specifically identified in the untreated and H ₂ O ₂ -treated plant samples.....	106

Chapitre III

Tableau 3. 1 : Interactions moléculaires 2cpA-RCS analysés avec DSV..	125
Tableau 3. 2 : Caractéristiques physico-chimiques des résidus identifiés..	126
Tableau 3. 3 : Récapitulatif des paramètres clés de la simulation MD du monomère... ..	134
Tableau 3. 4 : Récapitulatif des paramètres clés de la simulation MD du dimère.....	138
Tableau 3. 5 : La carbonylation module la T _m de la 2-CysPrx.	149
Tableau 3. 6 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de l'activité enzymatique.....	156

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure 1. 1 : Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)..	2
Figure 1. 2 : Sites majeurs de production des ERO dans les cellules végétales..	3
Figure 1. 3 : Propriétés des ERO..	4
Figure 1. 4 : Conséquences cellulaires des ERO..	5
Figure 1. 5 : Modèle montrant les voies de transduction du signal des ERO.....	7
Figure 1. 6 : La signalisation rétrograde du chloroplaste et de la mitochondrie.....	8
Figure 1. 7 : Arbre phylogénétique des Prx des plantes supérieures.	10
Figure 1. 8 : Vue d'ensemble de la localisation subcellulaire des Prx d' <i>A. thaliana</i>	11
Figure 1. 9 : Modifications oxydatives post-traductionnelles de la cystéine.....	13
Figure 1. 10 : Vue d'ensemble de l'implication de MKK3 dans les modules MAPKs. ...	14
Figure 1. 11 : Mécanismes généraux de la carbonylation des protéines.....	17
Figure 1. 12 : Mécanismes de la carbonylation des protéines..	20
Figure 1. 13 : Exemples de méthodes d'analyse des protéines carbonylées.	22
Figure 1. 14 : Activation de la signalisation cellulaire par la carbonylation.....	24
Figure 1. 15 : Rôle de la carbonylation des protéines dans la transduction du signal.. ...	25

Chapitre II

Figure 2. 1. Exogenous H ₂ O ₂ modulates protein carbonylation in <i>A. thaliana</i> ..	45
Figure 2. 2. A Venn diagram of the carbonylated proteins.....	46
Figure 2. 3. Gene ontology enrichment analysis.....	59
Figure 2. 4. Predicted sub-cellular localization of the carbonylated proteins.....	59
Figure 2. 5. Protein-protein interaction networks inferred from the carbonylated prot. ...	61
Figure S2. 1. Exogenous H ₂ O ₂ modulates protein carbonylation in <i>A. thaliana</i> ..	69
Figure S2. 2. Exogenous H ₂ O ₂ modulates the level of protein carbonylation.	70
Figure S2. 3. Exogenous H ₂ O ₂ modulates the level of protein carbonylation..	71

Chapitre III

Figure 3. 1 : L'amarrage moléculaire 2cpA-RCS avec le monomère.....	123
Figure 3. 2 : L'amarrage moléculaire 2cpA-RCS avec le dimère.....	124
Figure 3. 3 : Expression hétérologue et validation de la carbonylation de la 2-CysPrx.	129
Figure 3. 4 : Les résidus Cys de la 2-CysPrx sont des cibles du 2-hexenal.....	131
Figure 3. 5 : La carbonylation affecte in silico la stabilité structurale du monomère....	133
Figure 3. 6 : La carbonylation affecte in silico la stabilité structurale du dimère.....	137
Figure 3. 7 : La carbonylation change la conformation native de la 2-CysPrx..	140
Figure 3. 8 : La carbonylation module la distribution de la taille des particules.....	143
Figure 3. 9 : La carbonylation affecte le comportement d'agrégation.....	146
Figure 3. 10 : La carbonylation n'entraîne pas un mauvais repliement de la 2cpA..	148
Figure 3. 11 : Exemple de résultats typiques de la détermination de la Tm.	150
Figure 3. 12 : La carbonylation réduit l'efficacité et la vitesse catalytique.....	155
Figure 3. 13 : La carbonylation n'inhibe pas l'activité chaperonne et antioxydante.....	159
Figure 3. 14 : La carbonylation module la sensibilité à la dégradation.....	162

Chapitre IV

Figure 4.1 Modèle conceptuel illustrant l'impact potentiel de la carbonylation	183
---	-----

Annexes

Figure A. 1 : Résumé de la stratégie opérationnelle ..	a
Figure A. 2 : La carbonylation des protéines est rythmée sur le cycle circadien.....	b
Figure A. 3 : Effet du H ₂ O ₂ -exogène sur la teneur intracellulaire des EROs..	d
Figure A. 4 : Analyse croisée des résultats des travaux de notre équipe de recherche..	e
Figure A. 5 : Méthode utilisée pour exécuter l'amarrage moléculaire..	f
Figure A. 6 : Analyse de la distribution de la taille moléculaire.....	g
Figure A. 7 : Analyse de l'effet de la carbonylation sur la stabilité thermique.....	h
Figure A. 8 : Le prétraitement germinatif des graines avec le H ₂ O ₂ (H ₂ O ₂ -priming)..	j
Figure A. 9 : Le 2-hexenal et l'acroléine aux concentrations de 25-300 µM provoquent une réduction de l'activité enzymatique spécifique de la 2cpA et de la 2cpB	k
Tableau I : Liste des modifications identifiés sur le protéome carbonylé	l

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

2cpA : 2-Cys peroxirédoxine A

2cpB : 2- Cys peroxirédoxine B

4-HNE : 4-hydroxynonéal

ABA : Acide abscissique

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGE : *Advanced glycation end products*

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AOX : Alternative oxydase

ARP : *Aldehyde reactive probe*

Cy-Hz : Cyanine hydrazide

Cys : Cystéine

DAB : 3,3-diaminibenzédine

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNPH : 2,4-Dinitrophénylhydrazine

DSV : *Discovery studio visualizer*

DTNB : Acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

GPX : Glutathion peroxydase

His : histidine

HPLC : *High-performance liquid chromatography*

IPTG : Isopropyl- β -D-thiogalactoside

KDa : Kilodalton

LC-MS/MS : *Liquid chromatography tandem mass spectrometry*

Lys : Lysine

MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*

MDA : Malondialdéhyde

MeJA : Méthyle jasmonate

MPTNE : Modification post-traductionnelle non enzymatique

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite

NBT : *Nitro blue tetrazolium*

PBS: *Phosphate-buffered saline*

PCR : *Polymerase chain reaction*

PDB : *Protein data bank*

Prx : Peroxirédoxine

PSI/PSII : Photosystème I / photosystème II

RCS : *Reactive carbonyls species*

Rg : Rayon de gyration

RMSD : *Root means square deviation*

RMSF : *Root means square fluctuation*

SDF : *Standard data file*

SOD : Superoxyde dismutase

Trx : Thiorédoxine

TrxR : Thiorédoxine réductase

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Contexte général : La perception du stress chez les plantes

Les plantes sont des organismes sessiles contraints de s'adapter en permanence aux fluctuations de leur environnement. Qu'il s'agisse de contraintes abiotiques (lumière, sécheresse, température, etc.) ou biotiques (pathogènes, herbivores, etc.), leur survie repose sur une plasticité phénotypique et métabolique exceptionnelle. Cette plasticité exige une capacité de perception et de transduction du signal rapide et précise. Parmi les mécanismes que les plantes utilisent pour traduire un signal de stress en réponse cellulaire, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) occupent une place centrale. Longtemps considérées comme de simples sous-produits toxiques du métabolisme aérobie, les ERO sont aujourd'hui reconnues comme des acteurs clés de la signalisation cellulaire (Choudhury et al., 2017 ; Mittler, 2017). Chez les plantes, elles agissent comme des rhéostats moléculaires, orchestrant des processus allant de la croissance racinaire à la mort cellulaire programmée (Mittler, 2017). Cependant, la frontière entre signalisation physiologique et stress oxydatif délétère est floue. Elle dépend de l'équilibre entre la production des EROs et l'efficacité des systèmes de détoxification (enzymes, antioxydants). C'est dans cette zone grise de l'oxydation que se situe « la carbonylation des protéines », une modification post-traductionnelle (PTM) non enzymatique et irréversible, qui pourrait constituer le chaînon manquant entre les dommages oxydatifs et la réponse adaptative structurée des plantes.

1.2. Les espèces réactives de l'oxygène

1.2.1. Origine des espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), en particulier les radicaux superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et hydroxyle (OH^{\cdot}) ainsi que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), sont des produits dérivés du métabolisme de l'oxygène moléculaire (O_2) dans la cellule (**Figure 1.1**). Elles se forment durant la transformation tétravalente de l' O_2 en H_2O ($O_2 + 4 e^- + 4 H^+ \rightarrow 2 H_2O$) (Gardès-Albert, 2006 ; Ramsay, 2019 ; Juan et al., 2021).

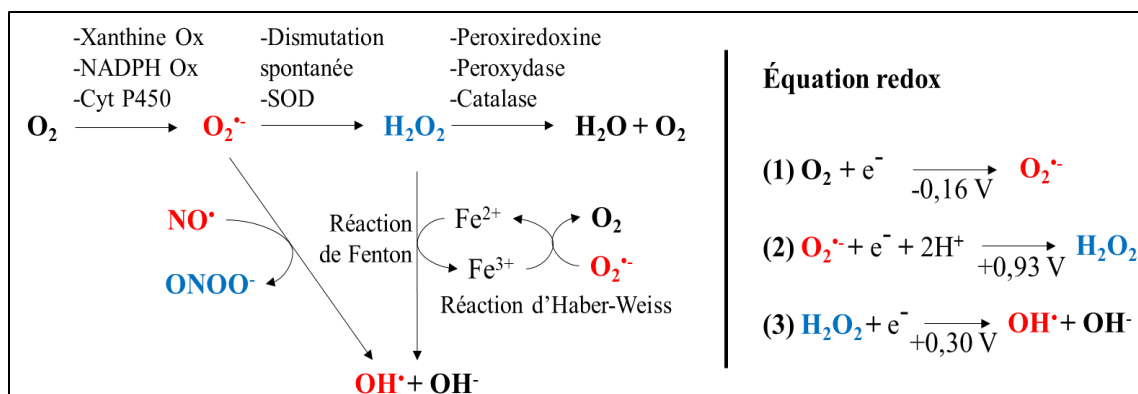


Figure 1. 1 : Les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est formé par l'addition d'un électron (e^-) sur l'oxygène moléculaire. Cette réaction est catalysée par différentes enzymes cellulaires : xanthine oxydase, NADPH oxydase et cytochrome P450. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est produit par l'addition d'un électron sur l' $O_2^{\cdot-}$. Dans la cellule, le H_2O_2 est formé par deux voies principales : la dismutation catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) et la dismutation spontanée. Quant au radical hydroxyle (OH^{\cdot}), il est produit dans la cellule grâce aux réactions d'Haber-Weiss et de Fenton. Il peut également provenir de la réaction entre l' $O_2^{\cdot-}$ et l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}).

Dans les cellules chlorophylliennes, les chloroplastes sont un site majeur de la production des ERO (**Figure 1.2**). L'oxygène singlet (1O_2) y est produit au niveau du centre réactionnel du photosystème II (PSII) lorsque le P680 est exposé à de fortes intensités lumineuses. Il est cependant rapidement piégé par les caroténoïdes rattachés au PSII, ce qui empêche la photoinhibition de la chaîne de transport des électrons (Laloi et al., 2006). L' $O_2^{\cdot-}$ est généré au niveau du PSI par transfert d'électron de la ferrédoxine à l' O_2 lorsque la production des électrons par la chaîne de transport excède leur consommation par la Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase). L' $O_2^{\cdot-}$ est toutefois rapidement métabolisé en H_2O_2 par la SOD, ou converti en OH^{\cdot} au cours de la réaction catalysée par les métaux de transition tels que le Fe^{2+} (Laloi et al., 2006). Le peroxysome est également un site important de la production des ERO. En effet, cet organite produit l' $O_2^{\cdot-}$ en réduisant l' O_2 grâce à la xanthine oxydase, et le H_2O_2 en métabolisant respectivement l' $O_2^{\cdot-}$ et le glycolate grâce à la SOD et la glycolate oxydase (Mhamdi et al., 2010). Le glycolate est formé dans le chloroplaste, puis déplacé vers le peroxysome lorsque la fixation du CO_2 par la Rubisco est ralentie (Gechev et al., 2006). La mitochondrie et l'apoplaste, via la chaîne respiratoire et la NADPH oxydase, respectivement, sont aussi des sites de production des ERO dans les cellules végétales (Mhamdi et al., 2010).

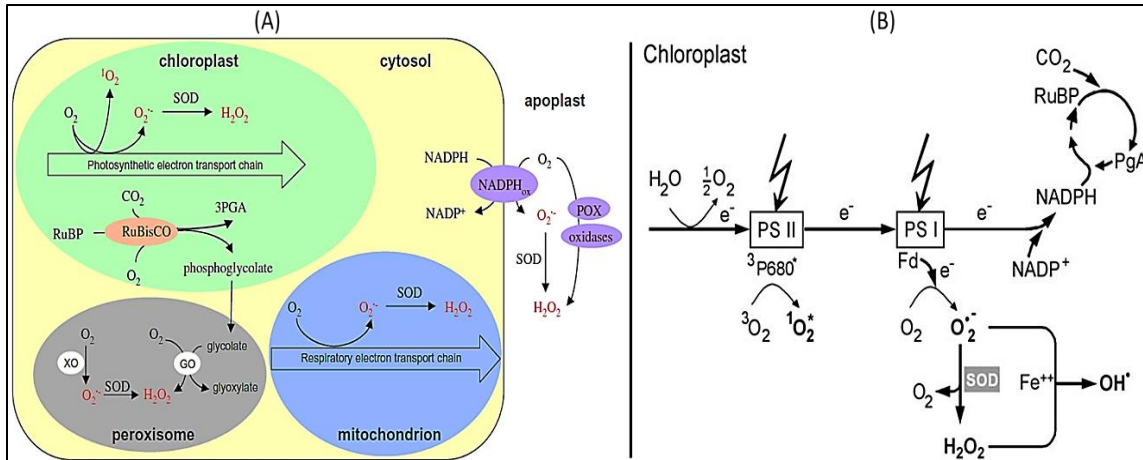


Figure 1. 2 : (A) Sites majeurs de production des ERO dans les cellules végétales chlorophylliennes (Mhamdi et al., 2010). SOD : superoxyde dismutase ; Rubisco : ribulose-1,5-biphosphatase carboxylase/oxygénase ; RuBP : ribulose-1,5-biphosphatase ; 3PGA : 3-phosphoglycératase ; POX : peroxydase ; XO : xanthine oxydase ; GO : glycolate oxydase. (B) Génération des ERO dans les chloroplastes (Laloi et al., 2006). L'oxygène singulet (1O_2) est produit lorsque la chlorophylle du centre réactionnel du photosystème II (PSII) triple excitée ($^3P680^*$) transfère son énergie d'excitation à l'oxygène triple (3O_2). Le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est généré dans le PSI par transfert d'électron de la ferrédoxine (Fd) à l'oxygène moléculaire (O_2) lorsque la production des électrons excède la capacité d'utilisation pour la fixation du CO_2 . L' $O_2^{\cdot-}$ produit est ensuite métabolisé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la SOD ou transformé en radical hydroxyle (OH^{\cdot}) par la réaction catalysée par les métaux de transition comme le Fe^{2+} .

1.2.2. Réactivité des ERO

Les ERO sont plus réactives que l' O_2 dont elles dérivent. Grâce à l'élucidation de leurs propriétés thermodynamiques et cinétiques, leurs réactivités chimiques vis-à-vis des matériaux biologiques ont dûment été établies (**Figure 1.3**). À titre d'exemple, l' $O_2^{\cdot-}$ est un radical ayant une faible réactivité avec les matériaux biologiques. Il est connu pour réagir avec des protéines à centre fer-soufre (Fe-S) et on l'attribue également comme cibles privilégiées la cytochrome C, la vitamine C et la SOD (Migdal et Serres, 2011 ; Mittler, 2017). Cependant, l' $O_2^{\cdot-}$ est considéré comme une molécule toxique via les réactions radicalaires secondaires ; il s'agit d'une toxicité indirecte via la production, par exemple, du radical perhydroxyle (HO_2^{\cdot}) qui réagit avec les acides gras polyinsaturés, et du peroxydinitrite ($OONO^{\cdot}$) connu pour ses effets délétères sur l'ADN, les protéines et les lipides (Gardès-Albert, 2006 ; Migdal et Serres, 2011). Le OH^{\cdot} est défini comme un

oxydant puissant qui s'attaque de manière non spécifique à tous les matériaux biologiques, à l'instar de l'ADN, des lipides et des protéines (Gardès-Albert, 2006 ; Migdal et Serres, 2011 ; Mittler, 2017). Toutefois, sa réactivité est limitée par sa faible capacité de diffusion et sa demi-vie relativement très courte. Quant au H₂O₂, bien qu'il ne soit pas un radical, il est tout aussi toxique que le OH[•]. Cependant, c'est un oxydant faible qui réagit avec des cibles spécifiques, notamment les protéines thiols (peroxirédoxine, thiorédoxine, etc.), les protéines de type hème et l'ADN (Mittler, 2017). Le H₂O₂ possède une demi-vie relativement longue et est capable de traverser toutes les membranes cellulaires par diffusion simple ou assistée par les aquaporines (ou peroxyporines) du fait de sa neutralité (Bersweiler, 2015). Par ailleurs, son métabolisme peut générer le OH[•] au cours de la réaction de Fenton (Mittler, 2017). En relation avec sa concentration cellulaire, le H₂O₂ peut conduire la cellule dans les mécanismes de la prolifération cellulaire, de l'arrêt de la croissance ou de l'apoptose (Dröge, 2002 ; Giorgio et al., 2007 ; Schieber et Chandel, 2014).

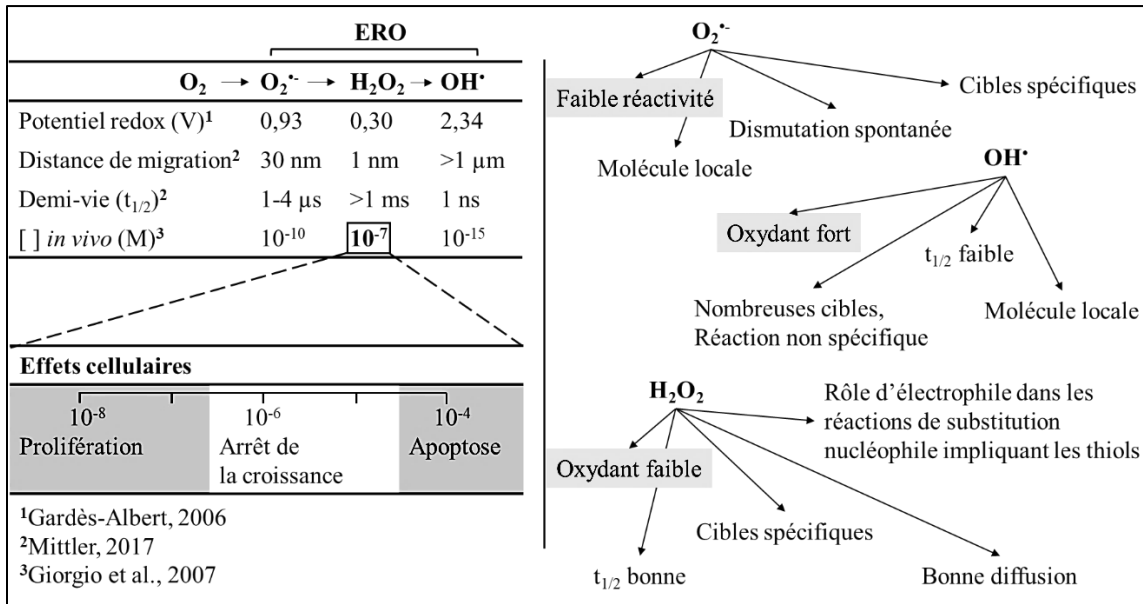


Figure 1. 3 : Propriétés des ERO. L'O₂^{•-} est un radical qui ne réagit qu'avec des matériaux biologiques spécifiques. C'est une molécule locale en raison de sa demi-vie relativement faible, 1 à 4 μs, et dont la finalité est la production du H₂O₂. Le H₂O₂ est un oxydant faible qui possède une demi-vie relativement longue (> 1 ms) et une bonne diffusion (1 nm) à travers des membranes cellulaires. Il peut ainsi se déplacer d'un compartiment cellulaire à l'autre et jouer un rôle d'électrophile dans les réactions de substitution nucléophile faisant intervenir les protéines thiols. Ainsi, le H₂O₂ est considéré comme une molécule de

signalisation pouvant activer dans la cellule les mécanismes de la prolifération, de l'arrêt de la croissance ou de l'apoptose. Quant au OH^\bullet , c'est un oxydant puissant qui n'a pas de cibles privilégiées, mais dont la durée de vie et la capacité de diffusion sont très faibles.

1.2.3. Rôle des ERO dans la signalisation redox et le stress oxydatif

Les ERO sont largement associées au principe du stress oxydatif du fait qu'elles peuvent modifier l'équilibre de l'état redox cellulaire (Foyer et Noctor, 2000 ; Mhamdi et al., 2010). En effet, les ERO peuvent endommager, en cas de surproduction non contrôlée, tous les matériaux biologiques de la cellule (Schieber et Chandel, 2014 ; Mittler, 2017). Cependant, on reconnaît aujourd'hui que les ERO agissent également comme des molécules de signalisation pour réguler de nombreux processus biologiques et physiologiques aussi bien chez les animaux que chez les végétaux (Dröge, 2002 ; Gechev et al., 2006 ; Mhamdi et al., 2010 ; Ray et al., 2012 ; Schieber et Chandel, 2014 ; Choudhury et al., 2017 ; Mittler, 2017). Ainsi, le paradoxe des ERO est qu'elles sont à la fois des molécules toxiques et bienveillantes. Leur production modérée et contrôlée peut favoriser une oxydation réversible des molécules environnantes (signalisation), tandis que leur surproduction, en relation ou non avec une défaillance du système antioxydant de la cellule, entraîne du stress oxydatif avec comme conséquence l'oxydation non spécifique et irréversible des matériaux biologiques (Dröge, 2002 ; Carrière et al., 2006 ; Migdal et Serres, 2011). La **figure 1.4** présente les effets cellulaires des ERO.

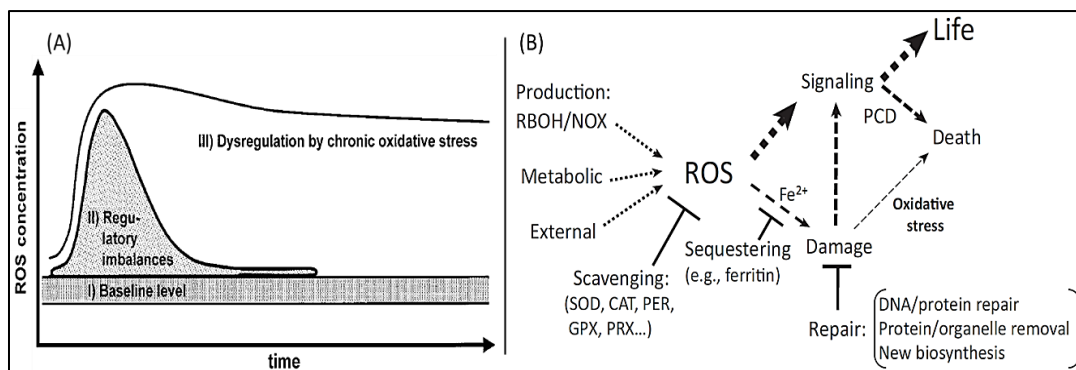


Figure 1.4 : Conséquences cellulaires des ERO. (A) Les événements régulateurs et leur dérèglement dépendent de l'ampleur et de la durée du changement de concentration des ERO. Les ERO sont normalement présentes dans les tissus vivants à des niveaux d'équilibre relativement faibles (i). L'augmentation régulée de la production des ERO entraîne un déséquilibre temporaire qui constitue la base de la régulation redox (ii). La

production persistante de quantités anormalement élevées des ERO peut toutefois entraîner des changements persistants dans la transduction des signaux et l'expression des gènes, ce qui, à son tour, peut donner lieu à des conditions pathologiques (iii) (Dröge, 2002). (B) Une combinaison de voies de piégeage des ERO et de réparation/élimination des dommages coopère dans les cellules pour prévenir la mort cellulaire par stress oxydatif. L'accumulation des ERO dans les cellules, médiée par les NADPH oxydases (RBOH/NOX), les voies métaboliques ou les sources externes, est atténuée par les mécanismes de piégeage des ERO cellulaires. Si les ERO réagissent avec le Fe^{2+} pour former des radicaux hydroxyles et causent des dommages cellulaires, un ensemble de voies de réparation, d'élimination et de remplacement réparent ces dommages et empêchent l'accumulation de composants cellulaires oxydés. Les dommages cellulaires peuvent également être évités en maintenant un faible niveau de fer labile (séquestration par la ferritine par exemple). La mort cellulaire due au stress oxydatif peut donc être évitée. Toutefois, la mort cellulaire peut résulter de l'activation de voies physiologiques (mort cellulaire physiologique ; PCD, *physiological cell death*), et ce processus peut être déclenché par des réactions ERO/redox ou par des systèmes de surveillance cellulaire qui contrôlent le niveau de dommages cellulaires. Abréviations : CAT, catalase ; GPX, glutathion peroxydase ; NOX, NADPH oxydase ; PER, peroxydase ; PRX, peroxiredoxine ; RBOH, *respiratory burst oxidase homolog* ; SOD, superoxyde dismutase (Mittler, 2017).

Les ERO sont détectées dans la cellule par au moins trois mécanismes cellulaires dont l'activation des facteurs de transcription et des récepteurs des ERO ainsi que l'inhibition des phosphatases (**Figure 1.5**). L'ensemble de ces mécanismes de détection concourent à l'activation de la protéine kinase OX11 (*OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1*) qui à son tour déclenche la cascade de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPKs, *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES*) et induit ainsi l'expression de nombreux gènes en aval qui régulent le niveau des ERO dans la cellule (Elhiti et Stasolla, 2015).

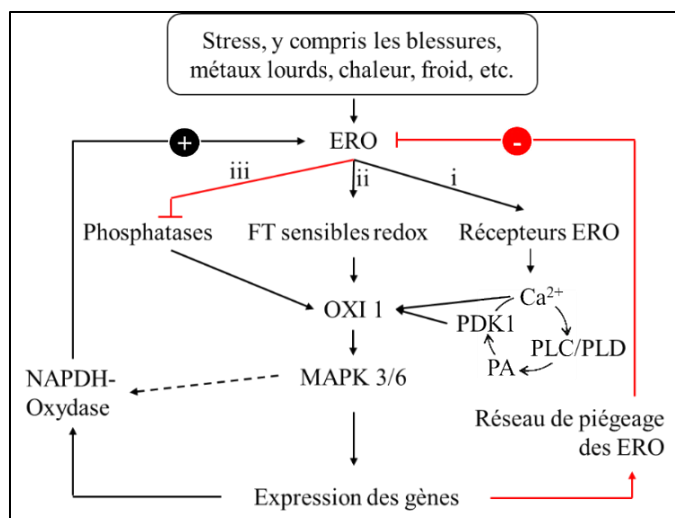


Figure 1. 5 : Modèle montrant les voies de transduction du signal des ERO dans les cellules végétales (Elhiti et Stasolla, 2015). Les ERO induites par le stress peuvent être détectées par au moins trois mécanismes différents : (i) l'activation des récepteurs des ERO qui déclenche des signaux Ca^{2+} , activant ainsi la protéine kinase OXI1 (*OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1*) soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire de la phosphoinositide-dépendante kinase 1 (PDK1). L'activation d'OXI1 induit la cascade de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPKs, *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES*) et, par conséquent, la régulation transcriptionnelle des facteurs en aval qui affinent l'homéostasie des ERO par leur production via la NADPH oxydase ou leur piégeage. (ii) Les ERO produites par le stress peuvent activer les facteurs de transcription (FT) sensibles à l'oxydoréduction, ce qui pourrait directement activer OXI1. (iii) L'inhibition des phosphatases par les ERO peut entraîner l'activation de plusieurs kinases, dont OXI1.

L'équilibre redox au sein des cellules est assuré grâce à la collaboration entre le cytosol et les organites cellulaires (chloroplaste, peroxyosome et mitochondrie) (Noctor et Foyer, 2016 ; Choudhury et al., 2017 ; Dizengremel, 2023). En effet, la production inhabituelle des ERO dans ces organites déclenchent des systèmes de signalisation dit rétrogrades qui permettent d'alerter le noyau, l'incitant à synthétiser des composés de réparation ou des enzymes antioxydantes à l'instar de l'AOX (*ALTERNATIVE OXYDASE*), une oxydase particulière qui captent directement les électrons pour réduire les ERO en H_2O (Dizengremel, 2023) (**Figure 1.6A**). Selon Noctor et Foyer (2016), la transmission d'informations des organites producteurs des ERO (mitochondrie, chloroplaste et peroxyosome) au noyau via les plaques tournantes cytosoliques peut se faire à l'aide des

transporteurs classiques ou par l'intermédiaires d'extensions organellaires (stromules, matrixules et peroxules, respectivement) (**Figure 1.6B-C**).

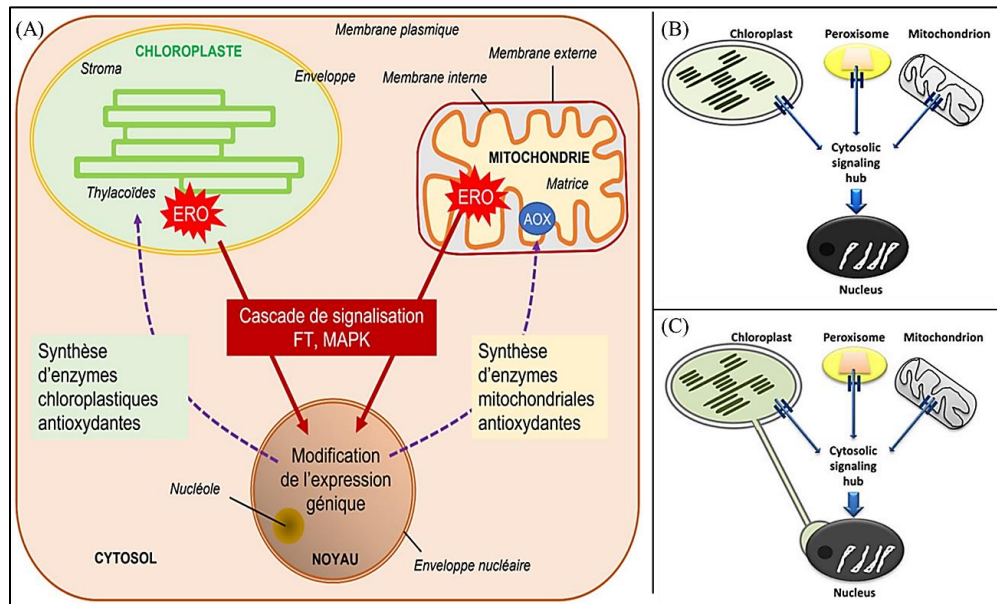


Figure 1. 6 : (A) La signalisation rétrograde du chloroplaste et de la mitochondrie vers le noyau pousse celui-ci à déclencher la synthèse des composés de réparation ou des enzymes antioxydantes (exemple de l'alternative oxydase, AOX, des mitochondries). Cette communication est essentielle pour le maintien de l'homéostasie de l'énergie intracellulaire lors du stress de faible et moyenne amplitude (Dizengremel, 2023). (B) Les fonctions classiques des transporteurs permettent au chloroplaste, au peroxysome et à la mitochondrie d'alimenter en informations les plaques tournantes cytosoliques qui transmettent le signal au noyau (Noctor et Foyer, 2016). (C) Transmission d'informations au noyau par l'intermédiaire d'extensions organellaires. Le Schéma montre un stromule relayant l'état du stroma au noyau, mais des extensions sont possibles à partir des peroxysomes (peroxules) et des mitochondries (matrixules) (Noctor et Foyer, 2016).

En dehors des effets délétères largement exposés dans la littérature scientifique, on attribue aux ERO plusieurs effets bénéfiques, dont l'activation de l'expression des gènes régulateurs du stress oxydatif via les signatures calciques et les protéines kinases, le maintien de la croissance des cellules, et la modulation de la transduction des signaux hormonaux et de la mort programmée des cellules (Dröge, 2002 ; Giorgio et al., 2007 ; Mhamdi et al., 2010 ; Schieber et Chandel, 2014 ; Elhiti et Stasolla, 2015). Aussi, l'étude réalisée par Nemoto et al. (2000) montre que les ERO produites dans la mitochondrie lors d'un excès de pyruvate déclenchent une voie de signalisation spécifique qui réoriente le

métabolisme vers l'anabolisme, plutôt que vers le catabolisme. À cet égard, les ERO sont considérées comme des senseurs des conditions énergétiques de la cellule. Cet effet yin et yang des ERO est contrôlé par le système antioxydant de la cellule. En effet, les cellules contiennent différents types d'enzymes capables de métaboliser le H_2O_2 , défini comme l'ERO le plus stable et possédant une bonne capacité de diffusion à travers les membranes cellulaires. Parmi ces enzymes, on peut citer la catalase, l'ascorbate peroxydase, les peroxirédoxines, la glutathion peroxydase et la glutathion S-transférase. En plus de ces enzymes, la cellule utilise une panoplie de molécules antioxydantes comme les vitamines C et E, les caroténoïdes, les flavonoïdes et les polyphénols pour contrôler le stress oxydatif induit par les ERO (Mittler, 2017).

1.2.4. Les peroxydases thiols, messagers dans la signalisation cellulaire redox associée au H_2O_2

Les peroxydases thiols (i.e. contenant un ou plusieurs groupements sulfhydryles, -SH) sont des protéines comprenant deux familles d'enzymes phylogénétiquement éloignées, les peroxirédoxines (Prx) et les glutathion peroxydases (Gpx), qui catalysent la réduction du H_2O_2 , des hydroperoxydes organiques (ROOH) ou du peroxyde d'azote ($ONOO^-$) (Dietz, 2011 ; Bersweiler, 2015) (**Figure 1.7**). Concernant les Prx, il s'agit de protéines ubiquitaires agissant comme des peroxydases thiol-dépendantes (Dietz, 2011 ; Bersweiler, 2015 ; Cerveau, 2016). En effet, ces enzymes de faible poids moléculaire, 20 à 30 kDa, ne sont pas hémiques (Fe-S) et leur activité catalytique est rattachée à un résidu de cystéine conservé dans la région N-terminale, la Cys peroxydatique ou C_P (Bersweiler, 2015 ; Cerveau, 2016). Certaines Prx, appelées communément 2-Cys Prx, possèdent un second résidu Cys conservé dans la région C-terminale, la Cys résolutive ou C_R , qui joue un rôle important dans la protection de la Prx contre l'hydroxydation de la C_P . Il existe 6 groupes de Prx, nommés A, B, C, D, E et F au regard des similitudes de séquence et de structure, et des positions des résidus Cys conservés (Dietz, 2011). Les groupes A à D sont communs et conservés chez tous les végétaux supérieurs et correspondent respectivement à la 2-Cys Prx typique (i.e. la protéine forme des ponts disulfures interchaînes C_P-C_R avec un autre monomère adjacent lorsque sa C_P est oxydée), la 1-Cys Prx, la PrxQ et la PrxII. La PrxQ et la PrxII sont des 2-Cys Prx atypiques (i.e. la protéine forme un pont disulfure intrachaîne

C_P-C_R lorsque sa C_P est oxydée). Le groupe E comprend les peroxydases bactériennes et le groupe F les homologues de Prx des archées (Dietz, 2011). Quant aux Gpx, il existe huit groupes dont, pour certaines, le site actif est une sélénocystéine (SeCysGpx : Gpx1 à 4, et selon les espèces Gpx6) et pour d'autres une cystéine (CysGpx) (Bersweiler, 2015). Les Gpx végétales sont des CysGpx et présentent un mécanisme de réaction similaire à celui des Prx atypiques (Dietz, 2011).

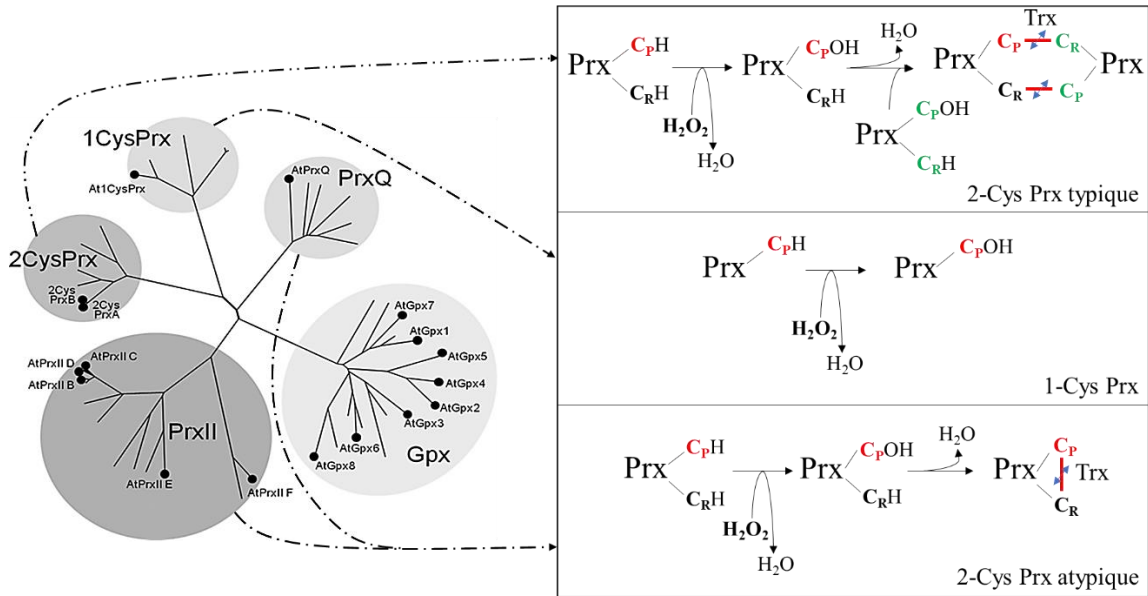


Figure 1. 7 : Arbre phylogénétique des Prx des plantes supérieures (Dietz, 2011). L'arbre montre les membres des quatre groupes de Prx des plantes supérieures, à savoir 2-Cys Prx, 1-Cys Prx, PrxQ et PrxII, ainsi que la famille des Gpx. La position des membres de Prx représentatifs d'*A. thaliana* est indiquée par des arêtes en forme de boule. À droite de l'arbre, les mécanismes enzymatiques des Prx sont décrits. Pour les 2-Cys Prx, on distingue la cystéine peroxydatique (C_P) et la cystéine résolutive (C_R). La C_P réagit avec le H₂O₂ pour former un sulfényle (C_POH), et la C_R de la même protéine (2-Cys Prx atypique : PrxQ et PrxII) ou du monomère adjacent (2-Cys Prx typique : 2-Cys PrxA et 2-Cys PrxB) réagit ensuite avec le sulfényle pour former un pont disulfure (C_P-C_R). Le pont disulfure est ensuite réduit par un donneur d'électrons, généralement de type thiorédoxine (Trx), ce qui régénère les groupement thiols de la C_P et de la C_R. Les 1-Cys Prx sont un groupe de Prx ne contenant pas dans leur séquence le résidu C_R.

Chez *A. thaliana* les Prx sont localisées dans le noyau (1-Cys Prx), le cytosol (PrxII B, PrxII C et PrxII D), le chloroplaste (PrxII E, Prx Q, 2-Cys PrxA et 2-Cys PrxB) et la mitochondrie (PrxII F) (Dietz, 2011) (**Figure 1.8**).

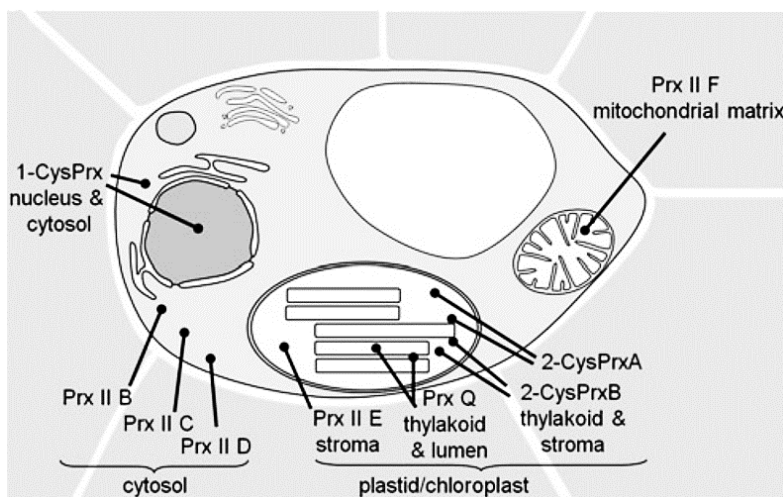


Figure 1. 8 : Vue d'ensemble de la localisation subcellulaire des Prx d'*A. thaliana*. La figure représente une cellule végétale avec différents compartiments et organites. Les flèches indiquent la localisation des Prx codées par le génome d'*A. thaliana* (Dietz, 2011).

Le H_2O_2 est susceptible de moduler l'activité des Prx par oxydation de leur C_R . En effet, les groupements thiols des cystéines sont connus pour leur grande sensibilité aux modifications redox et peuvent subir plusieurs degrés d'oxydation, allant de la formation des disulfures (RS-SR) et des sulfényles (RSOH) à des oxydations plus poussées (Reddie et Carroll, 2008) (**Figure 1.9A**). La formation des ponts disulfures est une réaction courante dans les protéines. Elle sert particulièrement à stabiliser la structure tertiaire de la protéine. Cependant, dans des conditions de stress oxydatif sévère, les atomes de soufre formant le pont disulfure peuvent subir des oxydations plus poussées, faisant ainsi passer le pont disulfure du disulfide au disulfone (**Figure 1.9A**). La formation du pont disulfure peut nécessiter l'oxydation des thiols en acides sulféniques (RSOH). Cependant, ces intermédiaires réactifs, importants dans la signalisation cellulaire, peuvent également subir des oxydations plus poussées, formant ainsi respectivement, selon qu'ils réagissent avec une ou deux molécules de H_2O_2 supplémentaires, des acides sulfiniques (RSO_2H) et sulfoniques (RSO_3H). La sulfonylation est une oxydation irréversible qui peut altérer la fonction de la protéine. Selon Reddie et Carroll (2008), le niveau d'oxydation des groupements thiols des protéines détermine la voie de signalisation qui sera activée en réponse au H_2O_2 . Dans leurs travaux, Meng et al. (2021) ont montré que la sensibilité des cystéines au H_2O_2 est essentielle à l'activation des voies de signalisation impliquant les MAPK comme intermédiaires. Toutefois, ce sont les types de protéines thiols recrutées en

amont des MAPKs par le H₂O₂ qui déterminent le type de réponse exprimé par la cellule (**Figure 1.9B**). Par exemple, l'oxydation de la protéine IRE-1 (*INOSITOL REQUIRING ENZYME 1*) sur son résidu Cys663 par le H₂O₂ est essentielle pour l'activation du facteur inductible SKN-1 de *Caenorhabditis elegans*, qui active à son tour les gènes de la réponse antioxydante dans des conditions de stress oxydatif. IRE-1 est une protéine transmembranaire de type 1 du réticulum endoplasmique (RE). Elle possède deux activités enzymatiques, sérine/thréonine kinase et endoribonucléase (Bouchecareilh et Chevet, 2009). SNK-1 est un homologue de Nrf2 (*NUCLEAR RESPIRATORY FACTOR 2*) des mammifères, et est défini comme un facteur de transcription répondant au stress oxydatif (Choe et Leung, 2013). Ainsi, cette voie de signalisation impliquant IRE-1 et SNK-1 montre la coopération entre le RE et le noyau dans le contrôle du stress du RE induit par le H₂O₂. Cependant, le recrutement et l'activation de la protéine IRE-1 ne sont pas nécessaires pour l'activation du facteur de transcription dépendant de l'AMP cyclique (ATF-7, *ACTIVATING TRANSCRIPTION FACTOR 7*) de *C. elegans*, qui induit l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée. Ainsi, les travaux de Meng et al. (2021) montrent non seulement l'importance de l'oxydation des protéines thiols dans la signalisation cellulaire du H₂O₂, mais également qu'il existe un mécanisme spécifique et rigoureux dans le recrutement et l'activation des messagers de la signalisation en amont et en aval des MAPKs.

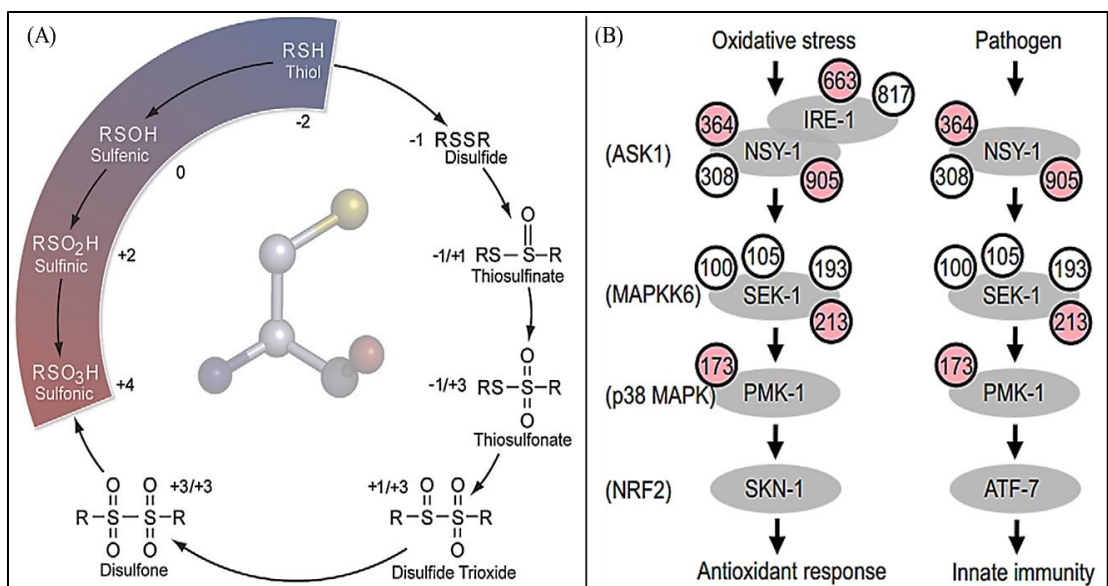


Figure 1. 9 : (A) Modifications oxydatives post-traductionnelles de la cystéine par le H₂O₂ (Reddie et Carroll, 2008). Le nombre d'oxydation de l'atome de soufre dans chacune des formes d'oxydation de la cystéine est indiqué. Ce nombre d'oxydation dépend du statut redox de la cellule, léger à sévère. (B) La voie de la MAPK p38 chez *C. elegans* (Meng et al., 2021). Les cystéines en rose ont été identifiées comme sensibles à l'oxydoréduction, tandis que les cystéines en blanc n'ont pas réagi au H₂O₂. Cette étude montre que la sensibilité des cystéines aux H₂O₂ est essentielle à l'activation des voies de signalisation impliquant les récepteurs serine/thréonine kinases (exemple du récepteur IRE-1 : *inositol requiring enzyme 1*) et les MAPKs. Le recrutement et l'activation du récepteur IRE-1 est indispensable dans l'établissement de la réponse contre le stress oxydatif, mais pas dans le cas d'une attaque pathogène.

Contrairement aux cellules animales, les facteurs en aval qui activent les MAPKs ne sont pas suffisamment caractérisés chez les plantes. Toutefois, Colcombet et al., (2016) ont décrit schématiquement des voies de signalisation impliquant les modules MAPKs de stress chez *A. thaliana* (**Figure 1.10**). Ainsi, les MAPKs participent à la signalisation et l'homéostasie des ERO chez les plantes en réponse aux attaques pathogènes (Dóczi et al., 2007), aux blessures (Takahashi et al., 2011), à l'acide abscissique (Ortiz-Masia et al., 2007; Danquah et al., 2015; Matsuoka et al., 2015), à l'acide jasmonique et à la lumière bleu (Takahashi et al., 2007).

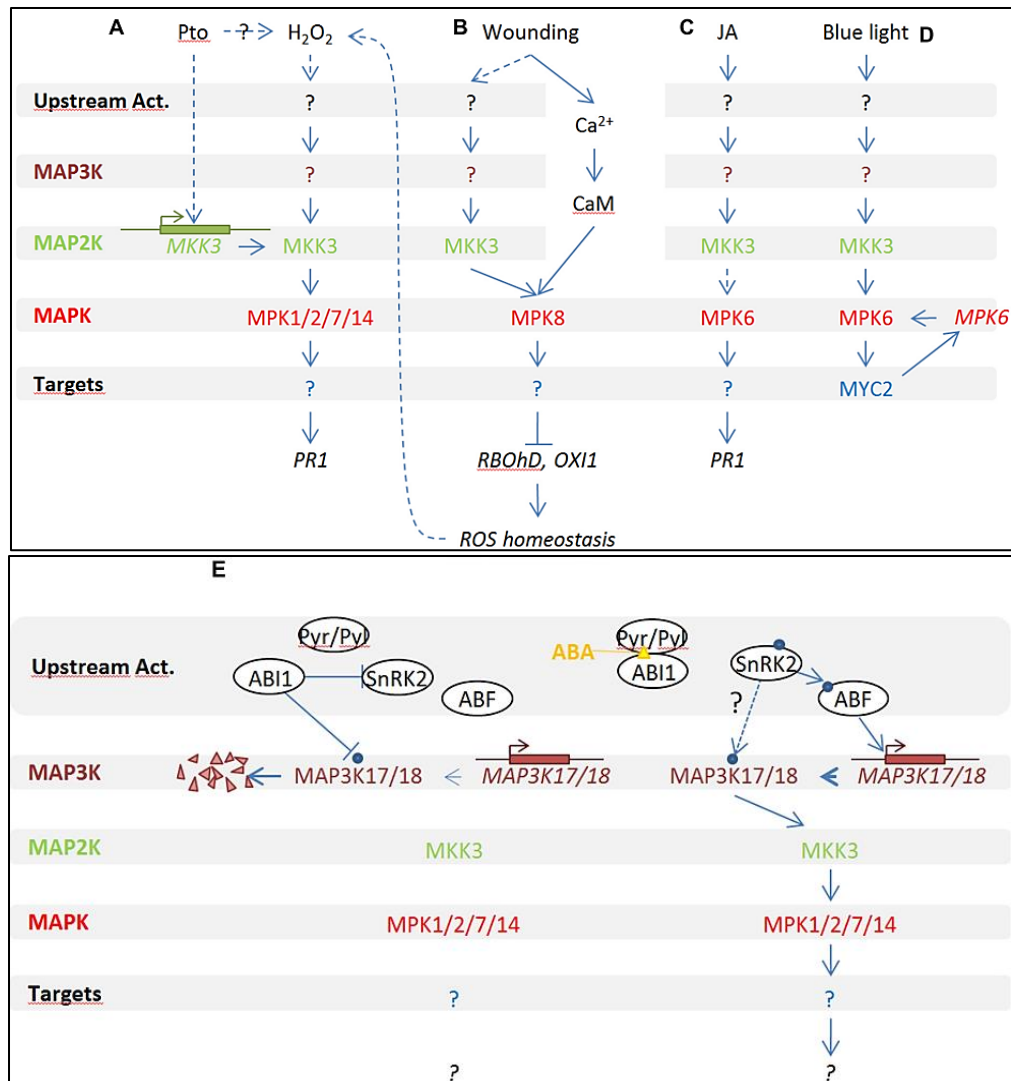


Figure 1. 10 : Vue d'ensemble de l'implication de MKK3 dans les modules MAPK chez *Arabidopsis thaliana* (Colcombet et al., 2016). MKK3 fonctionne en amont de MPK1/2/7/17 en réponse au H₂O₂ (A) et à l'ABA (E), de MPK8 en réponse à la blessure (B) et avec MPK6 en réponse à l'acide jasmonique (C) et à la lumière bleue (D). Ces différentes voies de signalisation ne sont pas totalement caractérisées. En effet, de nombreux acteurs en aval et en amont des MAPK n'ont pas encore été identifiés. Pto : récepteur de reconnaissance des pathogènes ; PR1 : protéine-1 liée à la pathogénèse.

1.2.5. Les RCS : messagers dans la signalisation cellulaire

Alors que les ERO, sont traditionnellement perçues comme les principaux effecteurs du signal redox, leur instabilité chimique et leur champ d'action restreint soulèvent des questions sur la transmission du signal à longue distance ou vers des cibles spécifiques. Les dérivés carbonyles réactifs (RCS, pour *Reactive Carbonyl Species*), produits en aval

des ERO par la peroxydation des lipides membranaires, émergent désormais comme un « chaînon manquant » de la signalisation redox chez les plantes (Mano et al., 2019).

1.2.5.1. Origine et propriétés physico-chimiques des RCS

Les RCS, incluant l'acroléine, le 4-hydroxy-(E)-2-nonéanal (4-HNE) et le (E)-2-hexéanal, sont des électrophiles caractérisés par une structure carbonylée α,β -insaturée (Mano et al., 2019). Contrairement aux ERO, les RCS possèdent une demi-vie plus longue et une plus grande stabilité chimique, ce qui leur permet de diffuser plus loin de leur site de production et d'agir comme des médiateurs mobiles du signal de stress (Mano et al., 2019). Leur accumulation est corrélée aux stimuli oxydatifs, et leur élimination par des enzymes de détoxification (ex : aldéhyde-énone réductases) atténue les réponses physiologiques induites par les ERO, confirmant leur rôle de messagers secondaires (Curtis et al., 2012).

1.2.5.2. Mécanismes d'action : la carbonylation comme interrupteur moléculaire

Le mode d'action principal des RCS réside dans leur capacité à modifier de manière covalente les résidus nucléophiles des protéines (Cys, His, Lys) via une addition de Michael ou la formation de bases de Schiff (Curtis et al., 2012). Cette modification, appelée carbonylation, n'est pas qu'une simple marque de dommage irréversible ; elle agit comme un interrupteur post-traductionnel modulant la fonction des protéines cibles (Tola et al., 2021). Par exemple, la carbonylation de protéines spécifiques peut déclencher la régulation du développement de la plante — les RCS interviennent dans la fermeture des stomates induite par l'acide abscissique (ABA) et le jasmonate de méthyle (MeJA) (Islam et al., 2016; 2020), le développement racinaire via l'auxine (Biswas et al., 2019) et le retard de croissance des plantes en cas de stress salin (Sultana et al., 2024). Ainsi, les RCS transforment un signal d'oxydation fugace en une modification protéique stable (carbonylation), permettant une réponse cellulaire structurée et coordonnée de la plante face aux fluctuations environnementales.

1.3. La carbonylation des protéines : rôle dans la signalisation du H₂O₂

1.3.1. Aspect général de la carbonylation des protéines

La carbonylation des protéines est une modification post-traductionnelle non enzymatique et irréversible (MPTNE) qui peut être bénéfique ou néfaste pour la cellule ou l'organisme (Fedorova, 2017 ; Reichmann et al., 2018 ; Tola et al., 2021). Ce processus biologique est lié aux ERO et s'effectue selon deux mécanismes généraux formant, selon le cas, des produits de carbonylation primaires ou secondaires des protéines (Ciacka et al., 2020 ; Rodríguez-García et al., 2020) (**Figure 1.11**). Les produits de carbonylation primaire des protéines sont obtenus par une attaque directe des chaînes latérales des résidus Lys, Arg, Pro et Thr par le H₂O₂ en présence des métaux de transition tel que le Fe²⁺ (MCO, *metal-catalysed oxydation*) (Fedorova, 2017 ; Ciacka et al., 2020 ; Rodríguez-García et al., 2020 ; Tola et al., 2021). Quant aux produits de carbonylation secondaire des protéines, ils sont issus de l'incorporation des dérivés carbonylés réactifs (RCS, *reactive carbonyl species*), produits de la peroxydation des lipides, sur les résidus Cys, His et Lys, ou de l'adduction des produits finaux de glycation avancée (AGE, *advanced glycation end products*) formés dans la cellule en présence de H₂O₂, de métaux de transition et de sucres réducteurs sur les résidus Lys, Thr et Pro (Ciacka et al., 2020).

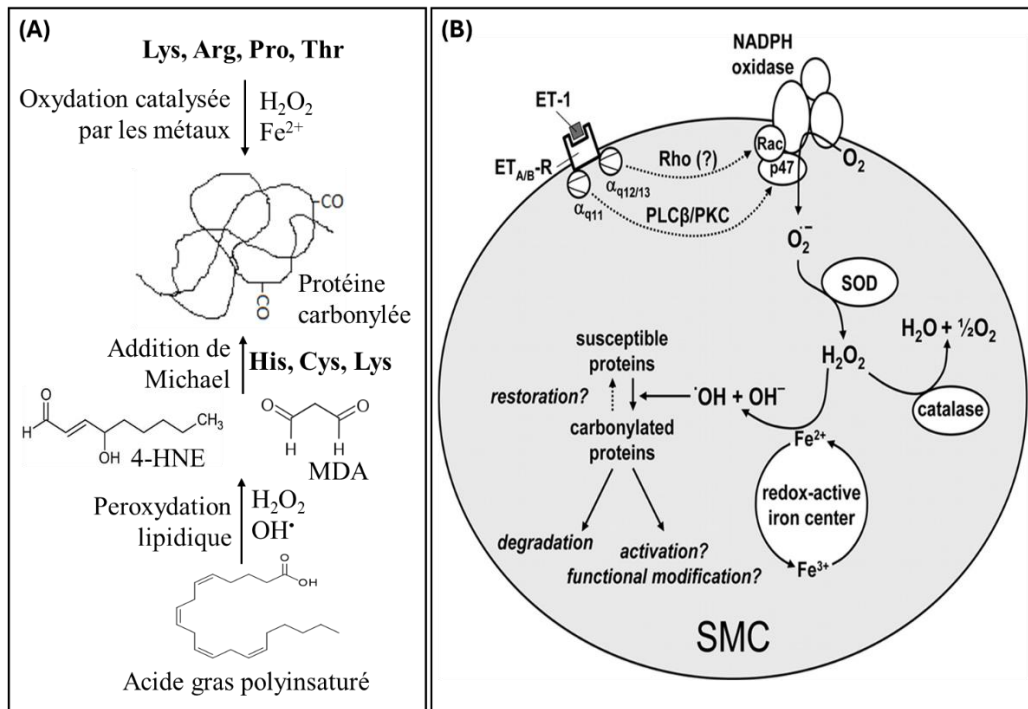


Figure 1. 11 : (A) Mécanismes généraux de la carbonylation des protéines. Les ERO peuvent provoquer la carbonylation des protéines en attaquant directement les résidus Lys, Arg, Pro et Thr en présence d'un métal de transition tel que le Fe^{2+} pour former des produits primaires de la carbonylation des protéines (oxydation catalysée par les métaux). La carbonylation des protéines est également possible à partir de l'incorporation sur les résidus His, Cys et Lys des dérivés carbonylés réactifs (RCS, *reactive carbonyls species* : exemples du 4-HNE, 4-hydroxynonéal, et du MDA, malondialdéhyde) issus de la peroxydation des acides gras polyinsaturés, pour former des produits secondaires de la carbonylation des protéines (addition de Michael). (B) Hypothèse avancée par Wong et al. (2008) et adaptée par Cattaruzza et Hecker (2008) sur le rôle de la carbonylation des protéines dans la transduction du signal des ERO. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires (SMC, *smooth muscle cells*) actives, le OH^\bullet catalyse la carbonylation des protéines sensibles, ce qui entraîne la dégradation de la protéine modifiée par le protéasome, la rend active, ou modifie éventuellement son état fonctionnel. Une question sujette à controverse est celle de savoir si la décarbonylation des protéines est possible dans certaines conditions.

Chez les animaux et les humains, la carbonylation des protéines est considérée comme un marqueur avéré du stress oxydatif (Dalle-Donne et al., 2003 ; Fritz et Petersen, 2011 ; Curtis et al., 2012 ; Suzuki et al., 2012 ; Fedorova, 2017), et les mécanismes par lesquels les ERO provoquent cette MPTNE ont été largement étudiés et discutés, de même que les voies de signalisation les impliquants (Curtis et al., 2012 ; Noctor et al., 2015 ; Ouznadj et Desmons, 2020). Cependant, l'importance biologique de la carbonylation des

protéines chez les plantes reste encore mal définie, car la caractéristique non enzymatique de cette forme d'oxydation a limité la volonté des chercheurs à identifier les processus biologiques qu'elle contrôle et régule chez les plantes (Tola et al., 2021). Ainsi, comprendre le rôle de la carbonylation des protéines dans le mécanisme de la transduction du signal des ERO chez les plantes reste un défi majeur en biologie redox.

1.3.2. Chimie de la carbonylation des protéines

Pour comprendre la signification biologique de la carbonylation des protéines chez les plantes, il est nécessaire de connaître la chimie complexe qui sous-tend cette MPTNE. En effet, tous les acides aminés des protéines ne sont pas sensibles à la carbonylation, et pour ceux qui le sont (Lys, Arg, Pro, Thr, Cys, His), plusieurs facteurs inhérents à la protéine peuvent influencer leur carbonylation. C'est le cas par exemple de la structure tridimensionnelle de la protéine qui peut exposer ou protéger les résidus sensibles des agents oxydants. Dans cette logique, les acides aminés sensibles situés dans les régions non structurées et les boucles exposées sont plus susceptibles d'être carbonylés que ceux situés dans le cœur hydrophobe de la protéine. En effet, il est connu que la chaîne latérale d'un acide aminé qui subit une modification post-traductionnelle préfère être accessible à la surface de la protéine (Ishii et al., 2003 ; Pang et al., 2007 ; Madian et Regnier, 2010). Par ailleurs, pour des protéines liant les métaux de transitions (fer, cuivre, zinc, etc.), le risque de carbonylation des résidus sensibles est plus élevé. Par exemple, Tola et Missihoun (2023) ont montré que la biodisponibilité du fer influence significativement le niveau de carbonylation des protéines dans les feuilles d'*A. thaliana*. La carbonylation étant une réaction non enzymatique, il est par ailleurs difficile de prévoir quel acide aminé sera finalement carbonylé lors de l'exposition de la protéine à un agent oxydant. De plus, les conditions environnementales telles que le pH, la salinité et la biodisponibilité des métaux de transition peuvent respectivement affecter le repliement de la protéine et la biodisponibilité des agents oxydants, notamment le OH^{*} et les RCS. Ainsi, selon les degrés de repliement de la protéine, les chaînes latérales des résidus sensibles peuvent voir leur accessibilité au solvant être considérablement réduite ou augmentée, ce qui affecte considérablement la probabilité qu'elles soient carbonylées, notamment par des agents oxydants hydrophiles comme les RCS.

Concernant la transformation des acides aminés sensibles en carbonyles, des études ont clairement décrit les différents mécanismes à l'origine de la formation des carbonyles primaires et secondaires dans la chaîne des protéines (Stadtman et Levine, 2003 ; Estévez, 2011 ; Estévez et al., 2019, 2022 ; Akagawa, 2021). Les carbonyles primaires sont formés via trois mécanismes : (i) la désamination oxydative des résidus Lys, Thr, Arg et Pro par voie radicalaire ou voie de Stadtman (**Figure 1.12A, i**), (ii) par voie de Maillard (**Figure 1.12A, ii**), et (iii) le clivage oxydatif du squelette peptidique par la voie de l' α -amidation ou par l'oxydation des chaînes latérales glutamyl (**Figure 1.12B, i-ii**). Quant aux carbonyles secondaires, ils sont formés dans la structure de la protéine par l'addition des RCS sur les résidus Cys, Lys et His au cours de la réaction d'addition de Michaël (**Figure 1.12C**).

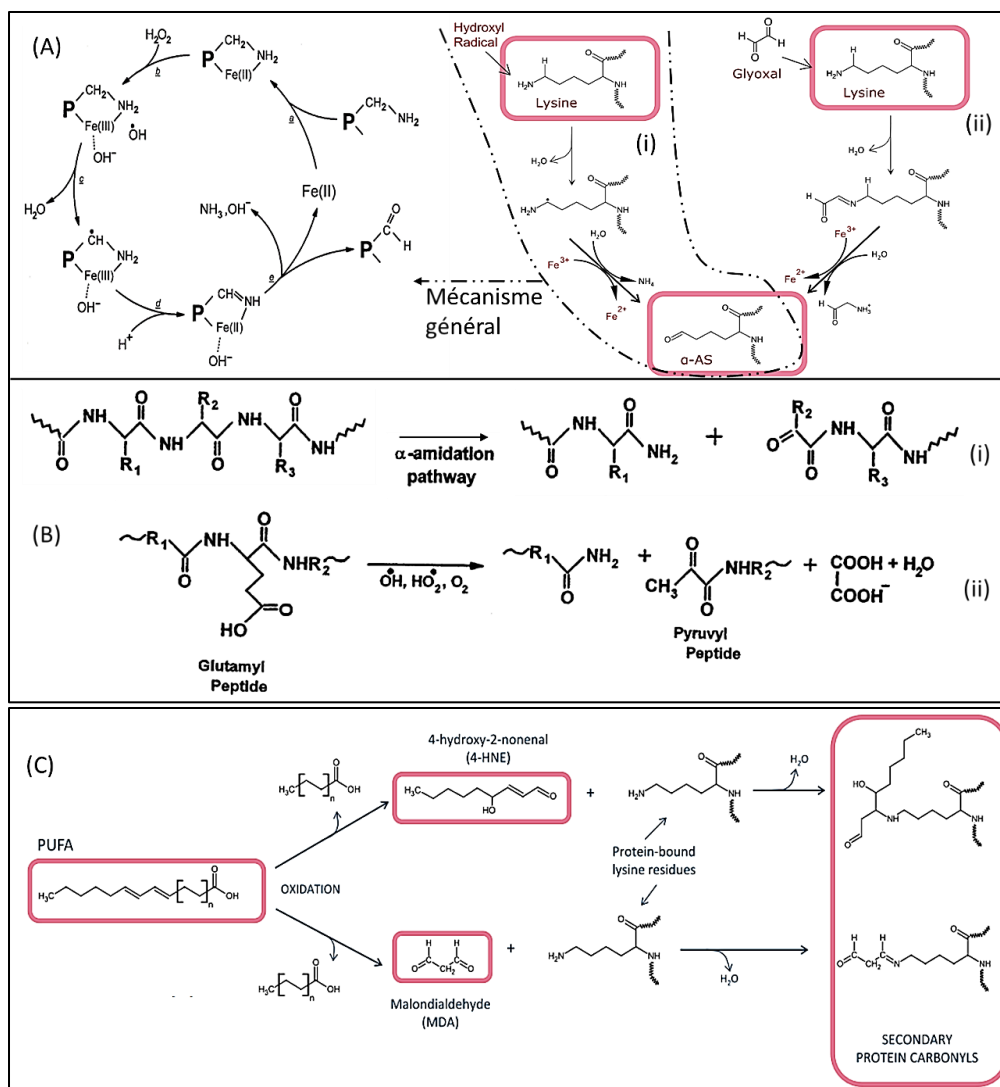


Figure 1. 12 : Mécanismes de la carbonylation des protéines. (A) Désamination oxydative de la lysine en acide α -aminoadipique, α -AS, par voie radicalaire ou voie de Stadtman (i) et par voie de Maillard (ii) (Estévez et al., 2022). (B) Clivage de la chaîne polypeptidique par les radicaux libres : (i) clivage par voies du diamide et de l' α -amidation ; (ii) clivage par oxydation des résidus glutamyl (Stadtman et Levine, 2003). (C) Addition de Michael du 4-hydroxynonéanal (4-HNE) et du malondialdéhyde (MDA) issus de la peroxydation des acides gras insaturés sur les résidus de lysine des protéines pour former des carbonyles protéiques secondaires (Estévez et al., 2022).

1.3.3. Approche analytique pour la détermination des protéines carbonylées

Il existe dans la littérature scientifique plusieurs méthodes d'analyses des protéines carbonylées, allant des méthodes les plus pratiques à mettre en œuvre, comme la spectrophotométrie et la fluorescence, à des méthodes plus sophistiquées comme la

chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, LC-MS/MS. Toutefois, selon Rogowska-Wrzesinska et al., (2014), le choix d'une méthode d'analyse des protéines carbonylées dépend du type d'échantillon, des objectifs expérimentaux et de l'instrumentation disponible. Aussi, des méthodes d'analyse peuvent être utilisées en combinaison dans un protocole de recherche. C'est le cas, par exemple, de la fluorescence, du Western blot et de la spectrométrie de masse, utilisées dans le même protocole de recherche pour détecter et quantifier les protéines carbonylées, les identifier et finalement déterminer leurs sites de carbonylation, respectivement.

Concernant l'analyse des protéines carbonylées par des méthodes pratiques comme la spectrophotométrie et la fluorescence, il est établi que les carbonyles protéiques n'ont pas de caractéristiques distinctives d'absorbance UV-visible ou de fluorescence (Akagawa, 2021). De ce fait, leur analyse nécessite leur dérivatisation avec des sondes chimiques spécifiques comme le DNPH (2,4-Dinitrophénylhydrazine) et les cyanines hydrazides, Cy-Hz. Le DNPH et les Cy-Hz s'attachent spécifiquement aux groupes carbonyles des chaînes latérales des acides aminés pour former des hydrazones stables. Dans le cas du DNPH, le 2,4-dinitrophénylhydrazone (DNP) formé a un maximum d'absorbance caractéristique compris entre 365 et 375 nm, et des tests immunochimiques (Dot Blot, Western blot, ELISA) basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux hautement spécifique contre le DNP peuvent être réalisés pour la détection et la quantification des protéines carbonylées (Akagawa, 2021). Dans le cas des sondes de Cy-Hz qui sont nombreuses et possèdent des propriétés chimiques plus ou moins distinctes (exemples : Cy7.5-Hz : excitation/émission, 788/808 nm ; Cy5.5-Hz : excitation/émission, 684/710 nm), leur utilisation pour l'analyse des protéines carbonylées par fluorescence est de plus en plus adoptée (Jaballi et Missihoun, 2022; Tola et Missihoun, 2023). Toutefois, la détection de la fluorescence de ces sondes nécessite des scanners beaucoup plus puissants et sophistiqués que dans le cas de l'utilisation du DNPH comme agent de dérivatisation. Dans notre équipe de recherche, nous employons les Cy7.5-Hz et Cy5.5-Hz pour la détection et la quantification des carbonyles dans les échantillons de protéines végétales.

Pour l'analyse plus poussées des carbonyles protéiques, notamment pour la détection des sites de carbonylation, la spectrométrie de masse est largement utilisée. En

effet, cette technique permet de déterminer la masse des protéines (si enrichissement au niveau des protéines) ou des peptides (si enrichissement au niveau des peptides ; ceci nécessite la digestion des protéines avec des enzymes comme la trypsine) et permet d'élucider leur structure chimique et leur composition. De ce fait, l'ajout ou la perte d'un groupement chimique d'un acide aminé entraîne une augmentation ou une diminution de sa masse moléculaire, ce qui peut permettre de déterminer la modification subie par le résidu. Par exemple, pour déterminer si la chaîne latérale du résidu Lys d'un peptide a été carbonylée par le 2-hexenal, on va vérifier si la masse moléculaire de ce résidu a augmenté de 98,07316 Da, ce qui correspond au décalage de masse exact du 2-hexenal. Dans plusieurs études, la spectrométrie de masse a été utilisée pour l'identification des sites de carbonylation des protéines (Roede et al., 2008 ; Kim et al., 2010 ; Guo et al., 2011 ; Zhang et al., 2016). La **figure 1.13** montre des exemples de méthodes d'analyse des protéines carbonylées.

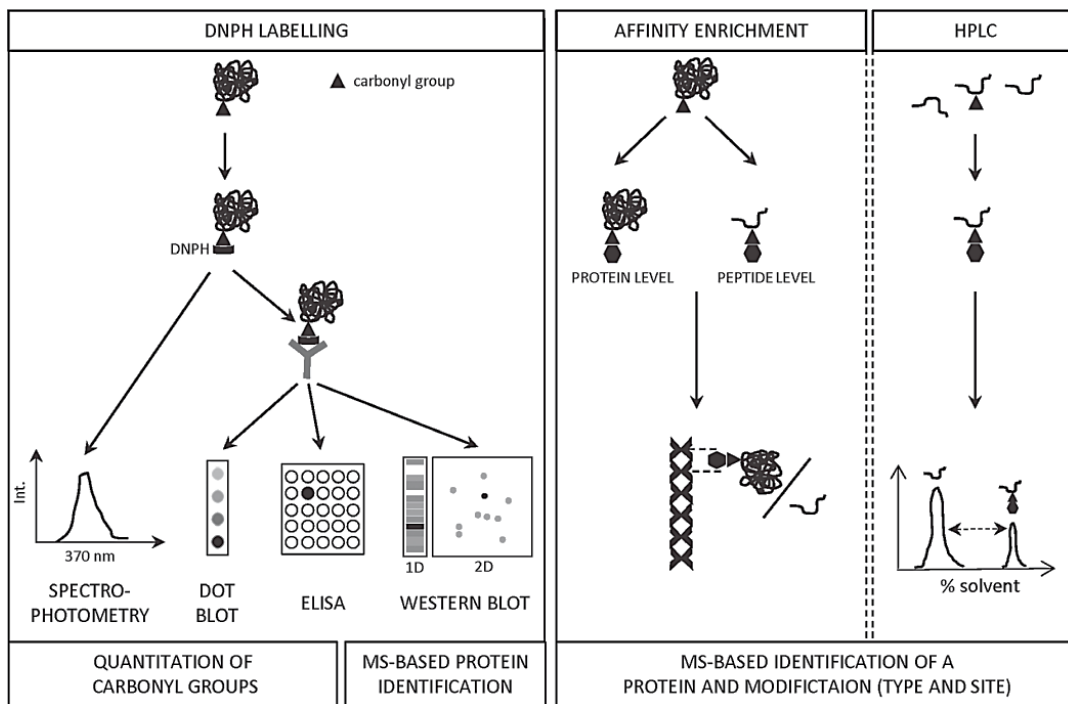


Figure 1.13 : Exemples de méthodes d'analyse des protéines carbonylées (Rogowska-Wrzesinska et al., 2014). En fonction du type d'échantillon, des objectifs expérimentaux et de l'instrumentation disponible, l'analyse de la carbonylation des protéines peut être effectuée par spectrophotométrie, Dot Blot, ELISA, Western blot, enrichissement par affinité ou par des méthodes basées sur la HPLC.

1.3.4. Importance de la carbonylation des protéines dans la signalisation des ERO

La carbonylation des protéines se déroulent naturellement dans tous les organismes vivants. Chez l'homme et les animaux par exemple, la carbonylation des protéines joue un double rôle dans les processus cellulaires et métaboliques. Par exemple, la carbonylation des cystéines critiques (Cys273 et Cys288) de la protéine Keap1 (*KELCH-LIKE ECH-ASSOCIATED PROTEIN 1*) par le 4-HNE entraîne la libération du facteur Nrf2 (*NUCLEAR FACTOR (ERYTHROID-DERIVED-2)-LIKE 2*) qui transloque vers le noyau où il se dimérise avec des facteurs nucléaires (exemple de Maf, *MUSCULO-APONEUROTIC FIBROSARCOMA ONCOGENE*) pour se lier à l'élément de réponse antioxydante (ARE, *ANTIOXIDANT RESPONSIVE ELEMENT*), activant ainsi une cassette de gènes liés à la réponse antioxydante (Curtis et al., 2012) (**Figure 1.13A**). La protéine Keap1 carbonylée est dégradée par le protéasome. En l'absence d'oxydation, le facteur Nrf2 reste séquestré dans le cytoplasme fixé au cytosquelette par la protéine Keap1, et il y est dégradé rapidement par le protéasome (Sykiotis et Bohmann, 2010 ; Boutten et al., 2011 ; Curtis et al., 2012). Contrairement à la carbonylation de Keap1 qui active la réponse contre le stress oxydatif via Nrf2 (système Keap1/Nrf2), la carbonylation de la thioredoxine (Trx) active la production des molécules pro-inflammatoires via la protéine ASK1 (*APOPTOSIS SIGNAL-REGULATING KINASE*) (système Trx/ASK1) (Curtis et al., 2012). En effet, l'activation d'ASK1, par la carbonylation de la Trx sur les résidus Cys32 et Cys35, entraîne une cascade d'événements liés à la phosphorylation de SEK et de JNK, aboutissant à l'activation du facteur nucléaire- κ B (NF- κ B), un facteur transcriptionnel majeur impliqué dans l'inflammation (Curtis et al., 2012) (**Figure 1.14B**). Ainsi, les voies de signalisation impliquant les systèmes Keap1/Nrf2 et Trx/ASK1 illustrent des boucles de rétroaction dans lesquelles la carbonylation de Keap1 et de la Trx par le 4-HNE active respectivement les réponses antioxydante et inflammatoire.

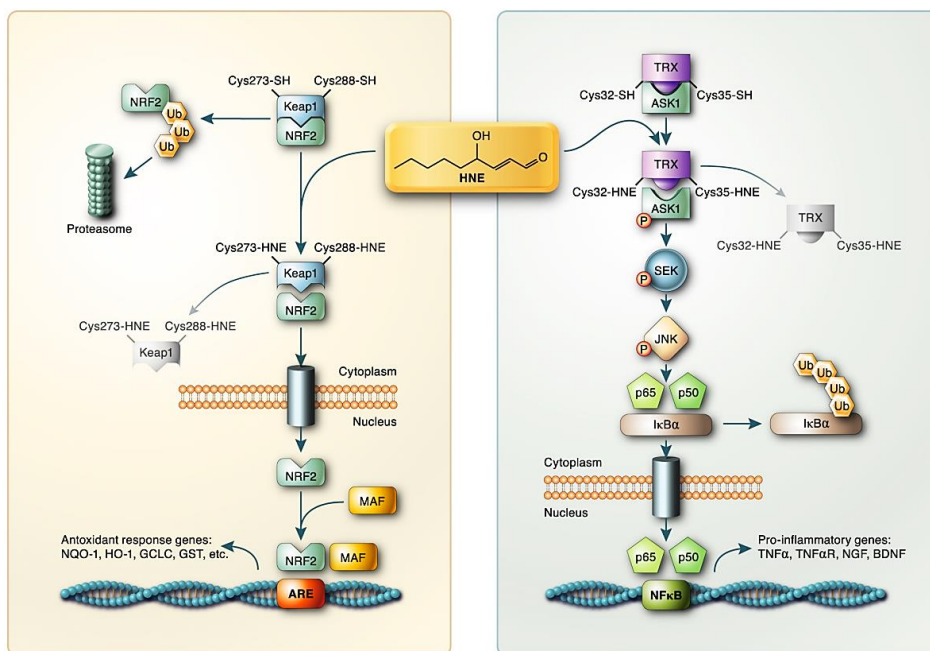


Figure 1. 14 : Activation de la signalisation cellulaire par la carbonylation des protéines (Curtis et al., 2012). La carbonylation des protéines entraîne non seulement l'inactivation des enzymes, mais aussi l'activation de plusieurs voies de signalisation. (Gauche) La carbonylation de Keap1 par le 4-HNE au niveau des cystéines critiques, Cys273 et Cys288, libère le facteur Nrf2 qui se transloque dans le noyau. Nrf2 activé s'hétérodimérise avec le facteur Maf et active la transcription d'une variété de cibles génétiques antioxydantes. (Droit) La carbonylation de la thiorédoxine, Trx, par le 4-HNE libère la kinase ASK1 qui phosphorylée, déclenche une cascade de signalisation via la phosphorylation de SEK et JNK. L'activation de JNK entraîne la phosphorylation d'IκBα et la translocation de p50/p65 vers le noyau et l'expression de cibles génétiques pro-inflammatoires. La Trx carbonylée et IκBα phosphorylé sont dégradés par le protéasome.

Chez les végétaux, on ne connaît pas encore réellement le rôle de la carbonylation des protéines dans la transduction du signal des ERO. Toutefois, plusieurs travaux montrent que les RCS sont impliqués dans les mécanismes tels que : (i) la formation des racines latérales dans la voie de signalisation de l'auxine (Biswas et al., 2019), (ii) la fermeture des stomates dans les voies de transduction de l'ABA et du MeJa (Islam et al., 2016, 2020) et (iii) dans le retard de croissance des plantes dans les conditions de stress salin (Sultana et al., 2024) (**Figure 1.15**). Les RCS fonctionnent en aval de la génération du H₂O₂ dans les voies de signalisation des hormones (Islam et al., 2016). Ainsi, bien que les protéines carbonylées impliquées dans les voies de signalisation mentionnées ci-dessus n'aient pas été identifiées, l'implication de la carbonylation des protéines a été proposée comme jouant

un rôle important dans la signalisation cellulaire des ERO dans les cellules végétales. En effet, l'utilisation de la carnosine et de la pyridoxamine (capteurs de RCS), n'inhibe pas la production de H₂O₂ dans la voie de l'ABA, mais empêchent la fermeture des stomates induite aussi bien par l'ABA que par le H₂O₂ (Islam et al., 2019).

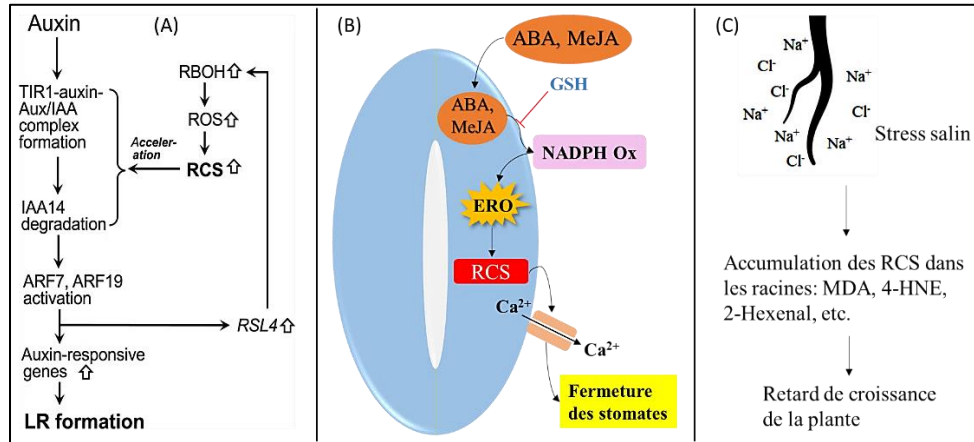


Figure 1. 15 : Rôle de la carbonylation des protéines dans la transduction du signal des ERO chez les plantes. Les hormones et le stress induisent la production des ERO qui génèrent à leur tour les RCS en attaquant les lipides. Ces RCS entraînent probablement la carbonylation de protéines spécifiques qui jouent un rôle important dans : (A) la formation des racines latérales (LR) dans la voie de signalisation de l’auxine (Biswas et al., 2019) ; (B) la fermeture des stomates dans la voie de signalisation de l’ABA et du méthyle jasmonate (MeJA) (Islam et al., 2016, 2020, adaptés par Tola et al., 2021) ; (C) le retard de croissance des plantes dans les conditions de stress salin (adapté de Sultana et al., 2024).

1.4. Problématique

L'étude des protéines carbonylées chez les plantes présente plusieurs défis, principalement en raison de la nature complexe de la carbonylation des protéines en tant que modification post-traductionnelle non enzymatique et irréversible, et de son rôle complexe dans la physiologie végétale. La carbonylation des protéines est induite par les ERO ou par la panoplie de RCS qu'elles génèrent en oxydant les lipides membranaires, ce qui complique l'identification et l'analyse fonctionnelle des protéines carbonylées chez les plantes. Cette complexité est augmentée par la nature dynamique et dépendante du contexte de la carbonylation, qui varie en fonction des conditions environnementales et des stades de développement de la plante. Les lignes ci-dessous décrivent les principaux problèmes liés à l'étude des protéines carbonylées chez les plantes.

(i) Défis en matière de détection et d'analyse des protéines carbonylées

La nature non enzymatique de la carbonylation des protéines rend difficile l'identification des mécanismes régulateurs qui la contrôlent chez les plantes. En effet, contrairement aux modifications post-traductionnelles enzymatiques à l'instar de la phosphorylation, la carbonylation n'a pas de voie de régulation directe, ce qui complique les efforts visant à étudier ses rôles fonctionnels *in vivo* (Tola et al., 2021; Tola et Missihoun, 2023). Par ailleurs, les schémas de la carbonylation des protéines chez les plantes sont influencés par divers facteurs, notamment l'homéostasie du fer, les stress environnementaux et les phytohormones comme l'ABA. Cette variabilité nécessite des études spécifiques au contexte pour comprendre les rôles précis des protéines carbonylées dans différentes conditions (Jaballi et Missihoun, 2022; Tola et Missihoun, 2023).

(ii) Implications fonctionnelles et lacunes dans les connaissances de la carbonylation des protéines chez les plantes

Bien que la carbonylation des protéines soit impliquée dans les voies de signalisation et les processus physiologiques tels que le vieillissement, la réponse au stress et la signalisation hormonale, ses rôles exacts restent sous-explorés chez les plantes. En effet, la carbonylation peut entraîner une modification de l'activité, de la dégradation ou de l'agrégation des protéines, mais les résultats spécifiques et leurs implications physiologiques ne sont pas encore clairement élucidés (Ciacka et al., 2020). Pourtant, les résultats d'études chez les animaux montrent que la carbonylation des protéines est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation (Curtis et al., 2012). Cependant, en raison des différences dans les contextes cellulaires entre les cellules animales et les cellules végétales, le transfert de ces résultats chez les plantes est difficile.

(iii) Limites méthodologiques et techniques de l'analyse des protéines carbonylées chez les plantes

L'identification des protéines carbonylées nécessite des techniques sophistiquées qui peuvent être gourmandes en ressources et techniquement exigeantes. Par exemple, le besoin de sonde ou d'anticorps spécifiques et d'une spectrométrie de masse avancée rend

difficile l'étude de la carbonylation chez les plantes (Mano et al., 2014; Jaballi et Missihoun, 2022; Tola et Missihoun, 2023). Aussi, la dégradation des protéines carbonylées par la voie du protéasome ajoute une couche de complexité supplémentaire, car elle influence les niveaux d'équilibre de ces protéines et leurs rôles fonctionnels. Comprendre la régulation de ce processus de dégradation est également crucial pour étudier la dynamique de la carbonylation des protéines chez les plantes (Jain et al., 2008).

(iv) Perspectives plus larges de l'étude de la carbonylation chez les plantes

Bien que l'étude des protéines carbonylées chez les plantes soit difficile, elle offre cependant la possibilité de découvrir de nouveaux mécanismes de régulation de la réponse au stress oxydatif. En effet, l'interaction entre les ERO, les RCS et la carbonylation des protéines pourrait fournir des informations cruciales sur la résilience des plantes et leur adaptation aux changements environnementaux. De plus, les progrès des technologies de détection et les études comparatives avec animaux peuvent aider à combler les lacunes existantes dans les connaissances et à améliorer notre compréhension des rôles de la carbonylation des protéines chez les plantes. Cependant, la complexité et la variabilité de la carbonylation nécessitent une approche multidimensionnelle intégrant des perspectives biochimiques, génétiques et physiologiques afin d'élucider pleinement ses fonctions chez les plantes.

1.5. Hypothèse et objectifs de la thèse

1.5.1. Hypothèse

Dans cette thèse, nous testons l'hypothèse selon laquelle la carbonylation des protéines jouent un rôle dans la transduction du signal intracellulaire des ERO chez les plantes.

1.5.2. Objectifs

1.5.2.1. Objectif général

L'objectif général de cette thèse est de déterminer le rôle de la carbonylation des protéines dans le mécanisme de la transduction du signal intracellulaire des ERO chez les plantes.

Pour atteindre cet objectif général, nous avons formulé deux objectifs spécifiques constituant les chapitres II et III de cette thèse.

1.5.2.2. Objectifs spécifiques

Objectif spécifique 1

Le premier objectif spécifique porte sur l'identification des protéines sensibles à la carbonylation en réponse au H₂O₂. Dans cet objectif dont les résultats constituent le chapitre II de cette thèse, nous avons utilisé le H₂O₂ en application foliaire chez *A. thaliana*, puis nous avons extrait et analysé le protéome des feuilles par LC-MS/MS afin d'identifier les protéines spécifiquement carbonylées en réponse au H₂O₂. Le choix d'utiliser le H₂O₂ est basé sur le fait que cette molécule est générée en abondance par la plupart des facteurs de stress biotique et abiotique. Il permet donc d'avoir une vue globale des protéines carbonylées en réponse au stress chez les plantes.

Objectif spécifique 2

Le second objectif concerne l'évaluation de l'impact de la carbonylation sur la structure, la stabilité et l'activité de la 2-Cys Prx d'*A. thaliana*. Cette peroxydase thiol-dépendante a été retenue comme protéine candidate dans cette thèse car nous l'avons identifiée dans l'objectif spécifique 1 (Chapitre II de la thèse) parmi les protéines sensibles à la carbonylation en réponse au H₂O₂. Il s'agit d'une protéine qui joue un rôle important dans la détoxification et la signalisation cellulaire du H₂O₂. De ce fait, nous avons produit les formes recombinantes de la 2-CysPrxA et de la 2-CysPrxB d'*A. thaliana* et nous avons induit *in vitro* leur carbonylation avec les RCS, le 2-hexenal et l'acroléine, car ces oxydants agissant en aval du H₂O₂ sont susceptibles de provoquer la carbonylation des résidus cystéines de la protéine. Les résultats de cet objectif spécifique sont présentés dans le chapitre III de cette thèse.

1.6. Références

Akagawa, M. (2021). Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radic Res* 55, 307–320. doi: 10.1080/10715762.2020.1851027

- Andrés Juan, C., Manuel Pérez de la Lastra, J., Plou, F. J., Pérez-Lebeña, E., and Reinbothe, S. (2021). Molecular sciences the chemistry of reactive oxygen species (ROS) Revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and induced pathologies. *Int. J. Mol. Sci* 22, 4642. doi: 10.3390/ijms
- Bersweiler Antoine (2015). Les peroxydases à thiol, relais dans la signalisation cellulaire redox associée au peroxyde d'hydrogène : Mécanismes moléculaires responsables de la spécificité de l'activation du facteur de transcription Yap1 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat de l'Université de Lorraine, soutenue le 9 décembre 2015. 207p
- Biswas, M. S., Fukaki, H., Mori, I. C., Nakahara, K., and Mano, J. (2019). Reactive oxygen species and reactive carbonyl species constitute a feed-forward loop in auxin signaling for lateral root formation. *Plant Journal* 100, 536–548. doi: 10.1111/tpj.14456
- Bouchecareilh, M., and Chevet, E. (2009). Endoplasmic reticulum stress: light my FIRE. *Medecine/Sciences* 25, 281–287. doi: 10.1051/medsci/2009253281
- Boutten, A., Goven, D., Artaud-Macari, É., and Bonay, M. (2011). La voie Nrf 2 en pathologie respiratoire. *Medecine/Sciences* 27, 966–972. doi: 10.1051/medsci/20112711012
- Carrière, A., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M. C., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2006). Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species. *Medecine/Sciences* 22, 47–53. doi: 10.1051/medsci/200622147
- Cattaruzza, M., and Hecker, M. (2008). Protein carbonylation and decarboylation: A new twist to the complex response of vascular cells to oxidative stress. *Circ Res* 102, 273–274. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.172148
- Cerveau Delphine (2016). Les 2-Cys peroxiredoxines plastidiales chez *Arabidopsis thaliana*: statut rédox, état d'oligomérisation, recherche de partenaires et rôles physiologiques. Thèse de doctorat de l'université Aix Marseille, soutenue le 25 février 2016. 372p
- Choe, K. P., and Leung, C. K. (2013). SKN-1/Nrf2, A new unfolded protein response factor? *PLoS Genet* 9. doi: 10.1371/journal.pgen.1003827
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., and Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal* 90, 856–867. doi: 10.1111/tpj.13299
- Ciacka, K., Tymiński, M., Gniazdowska, A., and Krasuska, U. (2020). Carbonylation of proteins-an element of plant ageing. *Planta* 252. doi: 10.1007/s00425-020-03414-1
- Colcombet, J., Sözen, C., and Hirt, H. (2016). Convergence of multiple MAP3Ks on MKK3 identifies a set of novel stress MAPK modules. *Front Plant Sci* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01941

- Curtis, J. M., Hahn, W. S., Long, E. K., Burrill, J. S., Arriaga, E. A., and Bernlohr, D. A. (2012). Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.008
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., and Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329, 23–38. doi: 10.1016/S0009-8981(03)00003-2
- Danquah, A., De Zélicourt, A., Boudsoq, M., Neubauer, J., Frei Dit Frey, N., Leonhardt, N., et al. (2015). Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 82, 232–244. doi: 10.1111/tpj.12808
- Dietz, K. J. (2011). Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxid Redox Signal* 15, 1129–1159. doi: 10.1089/ars.2010.3657
- Dóczy, R., Brader, G., Pettkó-Szandtner, A., Rajh, I., Djamei, A., Pitzschke, A., et al. (2007). The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell* 19, 3266–3279. doi: 10.1105/tpc.106.050039
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001
- Elhiti, M., and Stasolla, C. (2015). “ROS Signalling in Plant Embryogenesis,” 197–214. doi: 10.1007/978-3-319-10079-1_10
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci* 89, 259–279. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.04.025
- Estévez, M., Díaz-Velasco, S., and Martínez, R. (2022). Protein carbonylation in food and nutrition: a concise update. *Amino Acids* 54, 559–573. doi: 10.1007/s00726-021-03085-6
- Estévez, M., Padilla, P., Carvalho, L., Martín, L., Carrapiso, A., and Delgado, J. (2019). Malondialdehyde interferes with the formation and detection of primary carbonyls in oxidized proteins. *Redox Biol* 26. doi: 10.1016/j.redox.2019.101277
- Fedorova, M. (2017). “Diversity of Protein Carbonylation Pathways: Direct Oxidation, Glycooxidation, and Modifications by Lipid Peroxidation Products,” in *Protein Carbonylation: Principles, Analysis, and Biological Implications*, (wiley), 48–82. doi: 10.1002/9781119374947.ch3
- Foyer, C. H., and Noctor, G. (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol* 146, 359-388 doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00667.x
- Fritz, K. S., and Petersen, D. R. (2011). Exploring the biology of lipid peroxidation-derived protein carbonylation. *Chem Res Toxicol* 24. doi: 10.1021/tx200169n

- Gardès-Albert, M. (2006). Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. *Ann Pharm Fr* 64, 365–372. doi: 10.1016/S0003-4509(06)75331-7
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., and Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28, 1091–1101. doi: 10.1002/bies.20493
- Guo, J., Prokai-Tatrai, K., Nguyen, V., Rauniyar, N., Ughy, B., and Prokai, L. (2011). Protein targets for carbonylation by 4-hydroxy-2-nonenal in rat liver mitochondria. *J Proteomics* 74, 2370–2379. doi: 10.1016/j.jprot.2011.07.009
- Ishii, T., Tatsuda, E., Kumazawa, S., Nakayama, T., and Uchida, K. (2003). Molecular basis of enzyme inactivation by an endogenous electrophile 4-hydroxy-2-nonenal: Identification of modification sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 42, 3474–3480. doi: 10.1021/bi027172o
- Islam, M. M., Ye, W., Akter, F., Rhaman, M. S., Matsushima, D., Munemasa, S., et al. (2020). Reactive carbonyl species mediate methyl jasmonate-induced stomatal closure. *Plant Cell Physiol* 61. doi: 10.1093/PCP/PCAA107
- Islam, M. M., Ye, W., Matsushima, D., Munemasa, S., Okuma, E., Nakamura, Y., et al. (2016). Reactive carbonyl species mediate ABA signaling in guard cells. *Plant Cell Physiol* 57. doi: 10.1093/pcp/pcw166
- Islam, Md. M., Ye, W., Matsushima, D., Rhaman, M. S., Munemasa, S., Okuma, E., et al. (2019). Reactive carbonyl species function as signal mediators downstream of H₂O₂ production and regulate [Ca²⁺]_{cyt} elevation in ABA signal pathway in Arabidopsis Guard Cells. *Plant Cell Physiol* 60, 1146–1159. doi: 10.1093/pcp/pcz031
- Jaballi, A., and Missihoun, T. D. (2022). The phytohormone abscisic acid modulates protein carbonylation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 174. doi: 10.1111/ppl.13658
- Jain, V., Kaiser, W., and Huber, S. C. (2008). Cytokinin inhibits the proteasome-mediated degradation of carbonylated proteins in Arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiol* 49, 843–852. doi: 10.1093/pcp/pcn060
- Kim, J. H., Sedlak, M., Gao, Q., Riley, C. P., Regnier, F. E., and Adamec, J. (2010). Dynamics of protein damage in yeast frataxin mutant exposed to oxidative stress. *OMICS* 14, 689–699. doi: 10.1089/omi.2010.0051
- Laloi, C., Przybyla, D., and Apel, K. (2006). A genetic approach towards elucidating the biological activity of different reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 1719–1724. doi: 10.1093/jxb/erj183
- Madian, A. G., and Regnier, F. E. (2010). Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J Proteome Res* 9, 3766–3780. doi: 10.1021/pr1002609

- Mano, J., Nagata, M., Okamura, S., Shiraya, T., and Mitsui, T. (2014). Identification of oxidatively modified proteins in salt-stressed Arabidopsis: A carbonyl-targeted proteomics approach. *Plant Cell Physiol* 55, 1233–1244. doi: 10.1093/pcp/pcu072
- Mano, J., Biswas, S., and Sugimoto, K. (2019). Reactive carbonyl species: A missing link in ROS signaling. *Plants* 8, 391. doi:10.3390/plants8100391
- Marco Giorgio, Mirella Trinei, Enrica Migliaccio, and Pier Giuseppe Pelicci (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9), 722-8. doi:10.1038/nrm2240
- Matsuoka, D., Yasufuku, T., Furuya, T., and Nanmori, T. (2015). An abscisic acid inducible Arabidopsis MAPKKK, MAPKKK18 regulates leaf senescence via its kinase activity. *Plant Mol Biol* 87, 565–575. doi: 10.1007/s11103-015-0295-0
- Meng, J., Fu, L., Liu, K., Tian, C., Wu, Z., Jung, Y., et al. (2021). Global profiling of distinct cysteine redox forms reveals wide-ranging redox regulation in *C. elegans*. *Nat Commun* 12. doi: 10.1038/s41467-021-21686-3
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., and Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: A focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61, 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282
- Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *Medecine/Sciences* 27, 405–412. doi: 10.1051/medsci/2011274017
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends Plant Sci* 22, 11–19. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002
- Nemoto, S., Takeda, K., Yu, Z.-X., Ferrans, V. J., and Finkel, T. (2000). Role for Mitochondrial Oxidants as Regulators of Cellular Metabolism. *Mol Cell Biol*, 20(19), 7311-8. doi: 10.1128/MCB.20.19.7311-7318.2000.
- Noctor, G., and Foyer, C. H. (2016). Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiol* 171, 1581–1592. doi: 10.1104/pp.16.00346
- Noctor, G., Lelarge-Trouverie, C., and Mhamdi, A. (2015). The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry* 112. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.09.002
- Ortiz-Masia, D., Perez-Amador, M. A., Carbonell, J., and Marcote, M. J. (2007). Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of Arabidopsis. *FEBS Lett* 581, 1834–1840. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.075
- Ouznadji, A., and Desmons, A. (2020). Les réactions d’oxydation des protéines et leurs biomarqueurs. *Revue Francophone des Laboratoires*, 522, 31-38, doi:10.1016/S1773-035X(20)30160-X

- Pang, C. N. I., Hayen, A., and Wilkins, M. R. (2007). Surface accessibility of protein post-translational modifications. *J Proteome Res* 6, 1833–1845. doi: 10.1021/pr060674u
- Pierre Dizengremel (2023). Contraintes environnementales et stress oxydant chez les plantes. *Encyclopédie de l'environnement*, 1–21. Consulté le 8 mai 2025, [en ligne ISSN 2555-0950]
- Ramsay, R. R. (2019). Electron carriers and energy conservation in mitochondrial respiration. *ChemTexts* 5. doi: 10.1007/s40828-019-0085-4
- Ray, P. D., Huang, B. W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24, 981–990. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008
- Reddie, K. G., and Carroll, K. S. (2008). Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr Opin Chem Biol* 12, 746–754. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.07.028
- Reichmann, D., Voth, W., and Jakob, U. (2018). Maintaining a Healthy Proteome during Oxidative Stress. *Mol Cell* 69. doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.021
- Rodríguez-García, A., García-Vicente, R., Morales, M. L., Ortiz-Ruiz, A., Martínez-López, J., and Linares, M. (2020). Protein carbonylation and lipid peroxidation in hematological malignancies. *Antioxidants* 9. doi: 10.3390/antiox9121212
- Roede, J. R., Carbone, D. L., Doorn, J. A., Kirichenko, O. V., Reigan, P., and Petersen, D. R. (2008). In vitro and in silico characterization of peroxiredoxin 6 modified by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chem Res Toxicol* 21, 2289–2299. doi: 10.1021/tx800244u
- Rogowska-Wrzesinska, A., Wojdyla, K., Nedić, O., Baron, C. P., and Griffiths, H. R. (2014). Analysis of protein carbonylation--pitfalls and promise in commonly used methods. *Free Radic Res* 48, 1145–1162. doi: 10.3109/10715762.2014.944868
- Schieber, M., and Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology* 24. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034
- Stadtman, E. R., and Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207–218. doi: 10.1007/s00726-003-0011-2
- Sultana, Most. S., Sakurai, C., Biswas, Md. S., Szabados, L., and Mano, J. (2024). Accumulation of reactive carbonyl species in roots as the primary cause of salt stress-induced growth retardation of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 176. doi: 10.1111/ppl.14198
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., and Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ* 35, 259–270. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x

- Sykiotis, G. P., and Bohmann, D. (2010). Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal* 3. doi: 10.1126/scisignal.3112re3
- Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., and Shinozaki, K. (2011). Calmodulin-dependent activation of MAP Kinase for ROS homeostasis in Arabidopsis. *Mol Cell* 41, 649–660. doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.029
- Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Seo, S., Yonezawa, M., et al. (2007). The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 805–818. doi: 10.1105/tpc.106.046581
- Tola, A. J., Jaballi, A., and Missihoun, T. D. (2021). Protein carbonylation: Emerging roles in plant redox biology and future prospects. *Plants* 10. doi: 10.3390/plants10071451
- Tola, A. J., and Missihoun, T. D. (2023). Iron availability influences protein carbonylation in *Arabidopsis thaliana* Plants. *Int J Mol Sci* 24. doi: 10.3390/ijms24119732
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J.C., Ishihama, Y., Peck, S.C., Shinozaki, K. (2013). Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Signal*, 9(6), 270. doi: 10.1126/scisignal.2003509.
- Wong, C. M., Cheema, A. K., Zhang, L., and Suzuki, Y. J. (2008). Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circ Res* 102. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.159814
- Zhang, H., He, D., Yu, J., Li, M., Damaris, R. N., Gupta, R., et al. (2016). Analysis of dynamic protein carbonylation in rice embryo during germination through AP-SWATH. *Proteomics* 16, 989–1000. doi: 10.1002/pmic.201500248

CHAPITRE II

PROTEOME-WIDE ANALYSIS OF HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED PROTEIN CARBONYLATION IN *Arabidopsis thaliana*

Georges Y. Fangué-Yapseu, Adesola J. Tola, Tagnon D. Missihoun

Published on 5th December 2022 in Frontier in Plant Science

2.1. Author contributions

Tagnon D. Missihoun and Georges Y. Fangué-Yapseu designed the research. Georges Y. Fangué-Yapseu performed the experiments. Georges Y. Fangué-Yapseu, Tola A. Julius and Tagnon D. Missihoun analyzed the data and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

2.2. Résumé

Introduction : La carbonylation des protéines est une modification post-traductionnelle non enzymatique et irréversible qui se produit naturellement dans les organismes vivants sous l'effet direct ou indirect des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Chez les animaux, des voies de signalisation impliquant de nombreuses protéines carbonylées ont été identifiées, soulignant le double rôle de ces molécules dans la transduction du signal des ERO. Chez les plantes, des études sur la signalisation des phytohormones (auxine, méthyljasmonate, acide abscissique) ont montré que les espèces carbonylées réactives (RCS : acroléine, malondialdéhyde, 4-hydroxynonénal, etc.), dérivées de l'action des ERO sur les lipides, jouent un rôle important dans la formation des racines secondaires et la fermeture des stomates. Cependant, les protéines carbonylées impliquées dans ces voies de signalisation restent à identifier.

Méthodes : Dans cette étude, nous avons analysé les protéines sensibles à la carbonylation par le peroxyde d'hydrogène exogène (H₂O₂) en établissant le profil du protéome carbonylé extrait des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* après un traitement au H₂O₂. Les protéines carbonylées ont été enrichies au niveau des peptides et analysées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Résultats et discussion : Nous avons identifié 35 et 39 protéines carbonylées de manière unique dans les échantillons de plantes non traitées et traitées au H₂O₂, respectivement. Par rapport au traitement de contrôle, l'analyse d'enrichissement de l'ontologie des gènes a révélé que la plupart des protéines carbonylées identifiées dans les échantillons de plantes traitées au H₂O₂ sont liées aux adényl-sulfate transférases et aux amidophosphoribosyl transférases impliquées dans la réponse du système immunitaire, la réponse de défense et la réponse au stimulus externe. Ces résultats indiquent que le H₂O₂ exogène a provoqué un changement dans le schéma de carbonylation des protéines dans les feuilles d'*A. thaliana*. La carbonylation des protéines peut donc influencer le transcriptome et le métabolisme des plantes en réponse au H₂O₂ et aux stimuli externes déclenchant des ROS.

Mots clés : cyanine hydrazide, peroxyde d'hydrogène, oxydation catalysée par un métal, réaction de défense des plantes, carbonylation des protéines, espèces électrophiles réactives.

2.3. Abstract

Introduction: Protein carbonylation is a non-enzymatic and irreversible post-translational modification that occurs naturally in living organisms under the direct or indirect effect of reactive oxygen species (ROS). In animals, signaling pathways involving numerous carbonylated proteins have been identified, highlighting the dual role of these molecules in ROS signal transduction. In plants, studies on phytohormone signaling (auxin, methyl jasmonate, abscisic acid) have shown that reactive carbonyl species (RCS: acrolein, malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, etc.), derived from the action of ROS on lipids, play important roles in secondary root formation and stomatal closure. However, the carbonylated proteins involved in these signaling pathways remain to be identified.

Methods: In this study, we analyzed proteins responsive to carbonylation by exogenous hydrogen peroxide (H₂O₂) by profiling the carbonyl proteome extracted from *Arabidopsis thaliana* leaves after H₂O₂ treatment. Carbonylated proteins were enriched at the peptide level and analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Results and discussion: We identified 35 and 39 uniquely carbonylated proteins in the untreated and the H₂O₂-treated plant samples, respectively. In comparison to the control treatment, gene ontology enrichment analysis revealed that most of the carbonylated proteins identified in the H₂O₂-treated plant samples are related to sulfate adenylyl transferases and amidophosphoribosyl transferases involved in the immune system response, defense response, and external stimulus-response. These results indicated that exogenous H₂O₂ caused a change in the pattern of protein carbonylation in *A. thaliana* leaves. Protein carbonylation may thus influence the plant transcriptome and metabolism in response to H₂O₂ and ROS-triggering external stimuli.

Keywords: cyanine hydrazide, hydrogen peroxide, metal-catalyzed oxidation, plant defense response, protein carbonylation, reactive electrophile species.

2.4. Introduction

Protein carbonylation is a non-enzymatic and irreversible post-translational modification linked to reactive oxygen species (ROS; superoxide anion radical: O₂^{•-}; hydrogen peroxide: H₂O₂; hydroxyl radical: OH[•]). Protein carbonylation can be beneficial or harmful to the cell or the organism (Fedorova et al., 2014; Reichmann et al., 2018; Tola et al., 2021). It interferes with the structural and functional properties of proteins, thus affecting their molecular and cellular interactions (Jaisson et al., 2017).

In animals and humans, protein carbonylation is considered a proven marker of oxidative stress (Fritz and Petersen, 2011; Fedorova et al., 2014) and reflects ROS-induced cell damage (Dalle-Donne et al., 2006). Signaling pathways involving the carbonylation of specific proteins have also been identified. For example, the carbonylation of the Keap1 protein by 2-hydroxynonenal (HNE) on its critical cysteine residues (Cys273 and Cys288) has the effect of releasing the nuclear transcription factor NRF2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) which controls the expression of antioxidant and cytoprotective genes via the regulatory sequence called the antioxidant response element (Curtis et al., 2012). Similarly, the carbonylation of the critical cysteine residues (Cys32 and Cys35) of the mammalian thioredoxin 1 (Trx1) by HNE was found to release the protein Apoptosis Signal-Regulating Kinase1 (ASK1) the phosphorylation of which induces a reaction

cascade resulting in the activation of pro-inflammatory genes (Curtis et al., 2012). The importance of ROS-induced protein carbonylation remains poorly understood in plants (Tola et al., 2021). However, studies showed that RCS participate in the mechanism of hormone signal transduction in plants. For example, (Biswas et al., 2019) showed that in auxin-stimulated *Arabidopsis thaliana* roots, the production of ROS via the hormonal activation of NADPH oxidases caused the levels of the reactive carbonyl species (RCS) acrolein, 4-hydroxynonenal (HNE) and crotonaldehyde to increase prior to the formation of lateral roots. Accordingly, the addition of carnosine, a carbonyl scavenger, suppresses auxin-induced lateral root formation. Similarly, RCS were found to accumulate prior to the closure of stomata and following the production of ROS induced by the treatment of leaves with abscisic acid (ABA) and méthyljasmonate (MeJA) (Islam et al., 2016; Islam et al., 2020). The scavenging of the RCS inhibited the closure of stomata upon ABA and MeJA. Recently, we identified a set of proteins that is specifically carbonylated in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to ABA (Jaballi and Missihoun, 2022). These studies established that the carbonylation of some plant proteins by the ROS is involved in the formation of secondary roots, stomatal closure, and signaling pathways of ABA, MeJA, and auxins.

ROS cause protein carbonylation by two general mechanisms forming either primary or secondary carbonylation products. The primary products are obtained by direct attack of the side chains of the residues of Lys, Arg, Pro and Thr by ROS, or by metal catalyzed oxidation in the presence of H₂O₂ (Wong et al., 2008; Fedorova, 2017; Ciacka et al., 2020; Rodriguez-Garcia et al., 2020; Tola et al., 2021). The secondary products result from the addition of either the RCS including malondialdehyde (MDA) and the α,β -unsaturated aldehydes and ketones (HNE, 4-oxo-2-nonenal, acrolein, etc.) or advanced glycation end products on Cys, His and Lys (Wong et al., 2008; Ciacka et al., 2020). Since the RCS derive from the peroxidation of membrane lipids by ROS, H₂O₂ is likely a major trigger of protein carbonylation *in vivo*. In this study, we examined this hypothesis by profiling the carbonylated proteome in response to exogenous H₂O₂. Our results showed that number of *A. thaliana* leaf proteins mostly related to the photosynthesis, plant defense response, and sulfur metabolism were differentially targeted for carbonylation by exogenous H₂O₂.

2.5. Material and methods

2.5.1. Plants and growth conditions

Twenty-one (21) days old seedlings of *A. thaliana* ecotype Colombia-0 (Col-0) were used in this study. The seeds were spread on moist sterile soil and stratified for 48 h at 4°C before being transferred to a Conviron growth chamber for germination (light/dark cycle: 12/12 h; white light: 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; day/night temperature: 21/18°C; relative humidity: 60%). Seven days after the emergence of the seedlings, the seedlings were transplanted into honeycomb trays and their growth was monitored for 14 days.

2.5.2. Treatments

For treatment, the seedlings were sprayed with 50 mL of 1, 5, 10, 20 and 50 mM H_2O_2 solutions (T1, T5, T10, T20, and T50, respectively) prepared from a stock solution of 30% H_2O_2 (Fischer Scientific). The seedlings of the control batch were treated with distilled water (T0). One hour after the treatment, the different samples for each treatment were made by combining the leaves harvested from a total of six seedlings. These samples were instantly frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C for subsequent analyses.

2.5.3. Protein extraction and labelling

For protein extraction and labeling, we used the method of Jaballi and Missihoun (2022) with some modifications. Briefly, the proteins were extracted from the plant powder at 4°C in 300 mL of a lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8; 0.1% v/v Triton X-100; 50 mM DTT; 10 mM EDTA; Sigma protease inhibitor) by centrifugation at 15,000 g for 10 min. The protein extracts of the H_2O_2 -treated plants were immediately labeled with the fluorescent cyanine 7.5 hydrazide probe (Cy7.5-Hz; excitation/emission: 788/808 nm), while those of the control samples were labeled either with Cy7.5-Hz or cyanine 5.5 hydrazide (Cy5.5-Hz; excitation/emission: 684/710 nm). The probes were purchased from Lumiprobe (USA) and dissolved in dimethyl sulfoxide to 10 mM stock solution. The labeling was carried out in the dark and at 23°C in a reaction buffer (0.1 M sodium acetate, pH 6.8; 0.1% SDS; 1 mM EDTA) for 1 h at 500 rpm. The reaction was stopped by adding sodium cyanoborohydride and saline phosphate buffer (PBS, pH 7) to the reaction medium,

followed by incubation for 15 min at room temperature. Then, the labeled proteins were precipitated in one volume of 20% (v/v) trichloroacetic acid, washed with an ethanol/ethyl acetate solution (1:1), air-dried, and finally re-suspended in the lysis buffer.

2.5.4. In-gel analysis of carbonylated proteins

The carbonylated proteome was analyzed by 12.5% (w/v) sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis (Laemmli, 1970). Ten micrograms (10 µg) of labeled proteins were loaded into the gel. After separation of carbonyl proteins, the gel was fixed with Azure A solution, then stained for total proteins with Azure red solution (excitation/emission: 520/610 nm) in Azure B staining buffer according to the manufacturer's recommendations (Azure Biosystems, USA). The gel image was then captured using the multiplex scanning method on the Azure Biosystems scanner (software version 1.2.1228.0) at different wavelengths (Cy5.5-Hz: 658 nm; Cy7.5-Hz: 784 nm) for the detection of carbonylated proteins. The red color and green color have been assigned to Cy5.5-Hz and Cy7.5-Hz, respectively. Total proteins were detected by gel scanning at 520 nm. The gray color was attributed to total proteins. Band intensity was measured with Azure Spot software (version 2.1097). To obtain a quantitative measure of the carbonylated proteins in each sample, we proceeded as described by Jaballi and Missihoun (2022). The values of the fluorescence intensity for each gel lane were exported into Excel for further processing. The data were normalized by dividing the fluorescence intensity value of Cy5.5 or Cy7.5-labeled samples with that of Azure Red corresponding to the proteins in the sample. The arithmetic mean and the standard deviation were calculated for each sample.

2.5.5. Protein carbonyl enrichment for LC-MS/MS analysis

To identify the carbonylated proteins contained in the different samples by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), the carbonylated proteins were enriched at the peptide level (Matamoros et al., 2018). A hundred micrograms of proteins were used as a starting material. The lysis buffer was first exchanged into 100 mL of 50 mM ammonium bicarbonate (ABC, 50 mM) by using a centrifugal device (Amicon Ultra-0.5; Millipore Sigma). The protein sample was then added with 11 mL of 10% deoxycholate and 1.5 mL of Tris-2-carboxyethylphosphine

(TCEP-HCl, 500 mM) to reduce the disulphide bridges at 60°C and 500 rpm for 30 min. For alkylation, 3.5 µL of 300 mM 2-iodoacetamide (IAA) was added followed by incubation in the dark at 37°C for 30 min at 550 rpm. Finally, the proteins were digested by adding 10 µL of a 0.2 µg/µL trypsin solution in the dark at 30°C for 16 h at 500 rpm. This reaction was stopped with 1.2 µL of formic acid. The carbonylated peptides were labeled with an aldehyde reactive probe (ARP; Dojindo Laboratories). ARP is a biotinylated hydroxylamine derivative, N'-aminoxy-methylcarbonylhydrazino-D-biotin, used for the derivatization, enrichment, and mass spectrometric characterization of the carbonylated proteins (Chavez et al., 2006). The hydroxylamine group of ARP specifically forms aldoxime/ketoxime derivatives with the aldehyde/keto groups present in carbonylated proteins, which are sufficiently stable for the subsequent analysis by LC-MS/MS. The use of ARP has been described as a method of choice in several studies to probe the carbonylated proteins and to facilitate the affinity purification and enrichment of the peptides with carbonylated residues (Bollineni et al., 2013; Fedorova, 2017; Matamoros et al., 2018). For this, one volume of 10 mM ARP was added to the peptides and the mixture was incubated in the dark at 27°C for 2 h at 700 rpm. The unbound ARP molecules were then removed from the medium by the solid phase separation method using the C18 column according to the manufacturer's recommendations (Agilent Technologies). After elution and vacuum dehydration in SpeedVac, the peptides were resuspended in 200 µL of PBS, then the carbonylated peptides were separated from the non-carbonylated peptides by affinity chromatography using an avidin slurry agarose column according to the manufacturer's recommendations (Thermo Fisher Scientific). The carbonylated peptides trapped by the avidin resin were eluted 5 times with 150 µL of a 0.1 M glycine solution, pH 2.8 at room temperature. The different fractions were neutralized with a 1 M Tris-HCl solution, pH 8, combined, partially dehydrated to a volume between 100-150 µL, desalted using the C18 column (Agilent Technologies), and finally completely dehydrated with a SpeedVac. The samples were stored at -80°C for subsequent analysis by mass spectrometry.

2.5.6. LC-MS/MS analysis and database searching

Mass spectrometry analyses and database searching were performed by the Proteomics Platform of the CHU de Québec Research Center (Quebec, Qc, Canada), as reported previously (Jaballi and Missihoun, 2022). The desalted peptides were analyzed by nanoLC/MSMS using a Dionex UltiMate 3000 nanoRSLC chromatography system (Thermo Fisher Scientific, USA) connected to an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Peptides were trapped at 20 ml/min in loading solvent (2% acetonitrile, 0.05% TFA) on a 5mm x 300 mm C18 pepmap cartridge pre-column (Thermo Fisher Scientific/Dionex Softron GmbH, Germering, Germany) for 5 minutes. Then, the pre-column was switched online with a Pepmap Acclaim column (Thermo Fisher) 50 cm x 75 µm internal diameter separation column and the peptides were eluted with a linear gradient from 5-40% eluent B (A: 0.1% formic acid, B: 80% acetonitrile, 0.1% formic acid) within 90 minutes, at 300 nL/min for a total run time of 2 hours. Mass spectra were acquired in a data-dependent acquisition mode using Thermo XCalibur software version 4.3.73.11. Full scan mass spectra (350 to 1800m/z) were acquired in the orbitrap using an AGC target of 4e5, a maximum injection time of 50 ms and a resolution of 120 000. Internal calibration using lock mass on the m/z 445.12003 siloxane ion was used. Each MS scan was followed by MSMS fragmentation of the most intense ions for a total cycle time of 3 seconds (top speed mode). The selected ions were isolated using the quadrupole analyzer in a window of 1.6 m/z and fragmented by Higher energy Collision-induced Dissociation (HCD) with 35% collision energy. The linear ion trap detected the resulting fragments at a rapid scan rate with an AGC target of 1e4 and a maximum injection time of 50 msec. Dynamic exclusion of previously fragmented peptides was set for a period of 20 seconds and a tolerance of 10 ppm.

MGF peak list files were created using Proteome Discoverer 2.3 software (Thermo). MGF sample files were then analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.5.1). Mascot was set up to search a contaminant database and Uniprot Reference *Arabidopsis thaliana* database (September 2020; 39449 entries) assuming digestion with trypsin. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.60 Da and a parent ion tolerance of 10.0 ppm. Carbamidomethyl of cysteine was specified in

Mascot as a fixed modification. Deamidation of asparagine and glutamine and oxidation of methionine were specified in Mascot as variable modifications. Two missed cleavages were allowed. Scaffold (version Scaffold_5.0.1, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS-based peptide and protein identifications. A false discovery rate of 1% was used for peptides and proteins. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

2.5.7. Determination of malondialdehyde content and catalase enzymatic activity

Extraction and assay of MDA were based on the method of Heath and Packer (1968) and performed as described before (Missihoun et al., 2011). Briefly, 100 mg of leaves were ground in 1 mL of 5% trichloroacetic acid (TCA) containing 1.25% glycerol. After centrifugation at 15,000 g for 10 min at 4°C, 1 mL of supernatant was added to 1 mL of 0.67% thiobarbituric acid (TBA) and the mixture was heated to 100 °C for 30 min, followed by rapid cooling in ice. The specific absorbance of the TBA-MDA adduct was determined by taking the difference between the absorbance value read at 532 nm and that read at 600 nm. The amount of MDA ($\mu\text{mol/g FW}$) was calculated with reference to the Beer-Lambert law ($\epsilon = 155 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Total protein catalase activity was measured by the hydrogen peroxide reduction method (Chance and Maehly, 1955).

2.5.8. Statistical analysis

Data analysis was performed using Graphpad Prism 8.0. All results were expressed as means \pm standard deviation and subjected to Analysis of Variance (ANOVA). Where significant differences were found, pairs of samples were compared using Tukey's test at $p < 0.05$.

2.6. Results

2.6.1. SDS-PAGE analysis of H₂O₂-induced protein carbonylation in the *Arabidopsis thaliana* plants

To assess the effect of exogenous H₂O₂ on protein carbonylation, 21-day-old seedlings were sprayed with various concentrations of H₂O₂ solutions. The seedlings of the control

treatment were treated with distilled water. After 1 h of incubation, the proteins were extracted, and the carbonylated proteins were labeled with cyanine hydrazide (Cy7.5-Hz) probe prior SDS-PAGE. We found that a treatment with 20 mM H₂O₂ triggered an increase of the relative intensity of the fluorescent probe, thus reflecting a higher level of carbonylated proteins compared to a treatment with 1 mM H₂O₂ or to the untreated plants (**Figures 2.1A, S2.1**). To better assess the effect of exogenous H₂O₂ on the carbonylation of proteins, we mixed 5 µg of proteins derived from the untreated plants and labeled with Cy5.5-Hz (red fluorescence) with 5 µg of Cy7.5-Hz-labeled proteins (green fluorescence) derived from the plants treated with H₂O₂ and then analyzed the mixture by SDS-Page. We found that the green fluorescence was prominent for several protein bands indicating a high level of protein carbonylation induced by the H₂O₂ treatment (**Figures 2.1B, S2.2**). Consistently with the increased of carbonylated proteins, the treatment with 20 mM H₂O₂ significantly increased the contents of malondialdehyde, (MDA) ($p < 0.0001$), a marker of lipid peroxidation, the contents of H₂O₂ ($p < 0.01$), and the catalase activity ($p < 0.0001$) compared to the plants treated with 1 mM and the untreated plants (**Figure 2.1C**). Additional tests revealed that the levels of carbonylated proteins in the plants treated with 5 and 10 mM H₂O₂ were alike the levels seen in the plants treated with 1 mM H₂O₂ whereas the level of carbonylated proteins in the plants treated with 50 mM H₂O₂ was similar to that found in the plants treated with 20 mM H₂O₂ (**Figure S2.3**). These results indicated that a concentration of 20 mM H₂O₂ would be optimal to profile the proteins targeted for carbonylation by H₂O₂. Subsequent experiments were then conducted with 1 mM and 20 mM H₂O₂ in comparison with the untreated plants; 1 mM being the smallest treatment that did not induce the increase in of protein carbonylation signal, and 20 mM being the treatment from which this signal markedly increased.

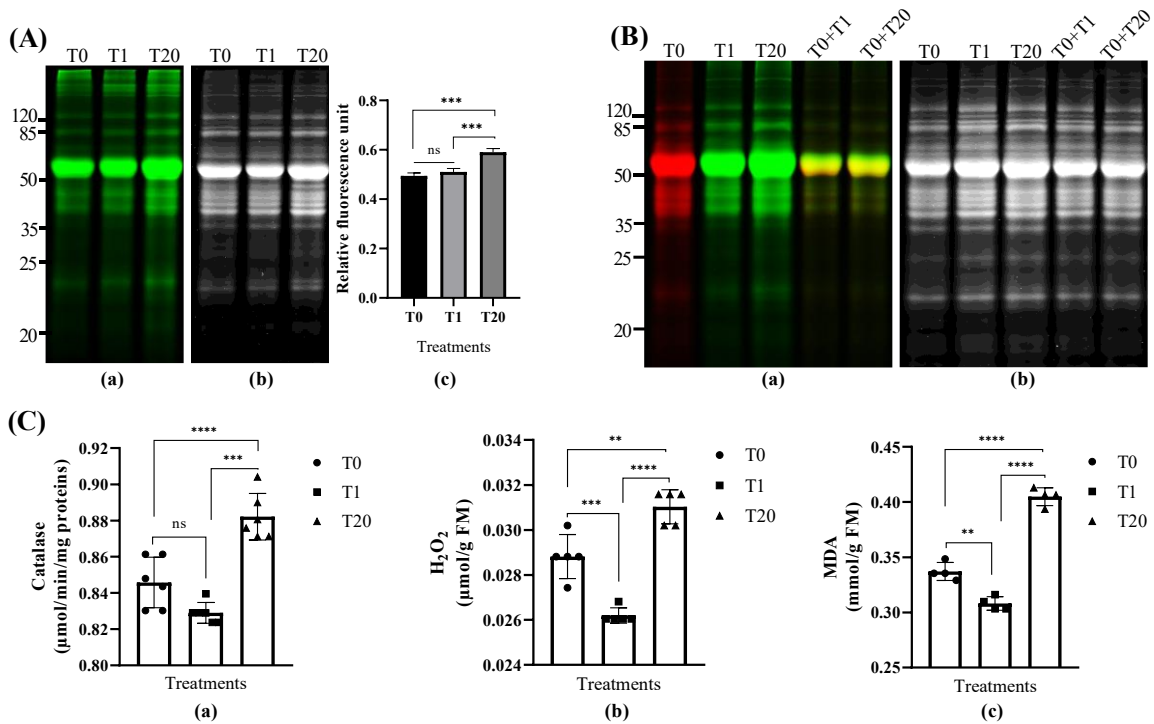


Figure 2. 1. Exogenous H₂O₂ modulates protein carbonylation in *A. thaliana* plant leaves. (A) Representative gel pictures for carbonylated proteins (a) and the total proteins stained with AzureRed (b) are shown. A total of 10 μg of proteins labeled with the carbonyl-reactive probes Cy7.5-Hz probe was loaded in each lane. T0: control, distilled water; T1: H₂O₂ at 1 mM; T20: H₂O₂ at 20 mM. The bar plot (c) represents relative fluorescence intensity of carbonylated proteins measured from the gel picture (a) by using the Azure biosystems software. Results are from at least three independent experiments and represent means \pm SEM (n=3). Asterisks denote statistical significance at $p < 0.001$, one-way ANOVA, Tukey post hoc test. ns: not significant. (B) Two probes-based gel comparison of carbonylated protein profiles. Representative gel pictures for the carbonylated proteins (a) and the total proteins stained with AzureRed (b) are shown. T0: control, distilled water; T1: H₂O₂ at 1 mM; T20: H₂O₂ at 20 mM. Carbonylated proteins in the control sample were labeled with Cy5.5-Hz probe, and those in the H₂O₂-treated plant samples were labeled with Cy7.5-Hz probe. Lanes T0+T1, and T0+T20 combine each equal amount (5 μg) of the Cy5.5-Hz-labeled control and Cy7.5-Hz-labeled H₂O₂-treated samples. (C) Catalase enzyme activity (a), H₂O₂ level (b), and MDA (c) in leaves of 21 days-old seedlings. Results are from at least three independent experiments and represent means \pm SEM (n=3). Two, three, and four asterisks denote statistical significance at $p < 0.01$, $p < 0.001$, and $p < 0.0001$, respectively; one-way ANOVA, Tukey post hoc test. ns: not significant.

2.6.2. Detection of H₂O₂-induced carbonylated proteins by LC-MS/MS

To identify the carbonylated proteome in response to exogenous H₂O₂, the protein extracts derived from the untreated plants and the plants subjected to 20 mM H₂O₂ were treated with the aldehyde reactive probe (ARP) to label the carbonylated proteins, which were subsequently pulled down with an avidin matrix and then analyzed by LC-MS/MS. We identified 311 and 293 carbonylated proteins for the three replicates of the untreated and treated samples, respectively. Of these, 154 and 150 carbonylated proteins were identified in the three replicates of the untreated and treated samples, respectively (**Tables S2.1, S2.2**). One hundred and fifteen (115) of the carbonylated proteins were simultaneously found in both the untreated and treated samples, whereas 39 and 35 carbonylated proteins were specifically identified in the untreated and treated samples, respectively (**Figure 2.2; Tables 2.1, 2.2, S2.3**).

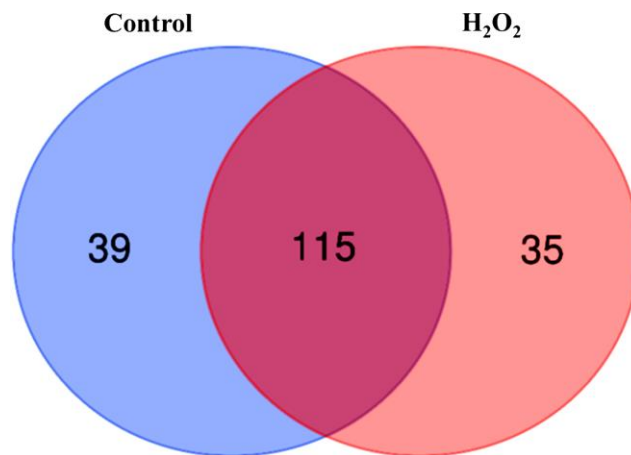


Figure 2. 2. A Venn diagram of the carbonylated proteins in the control plant samples and the H₂O₂-treated plant samples. The diagram was generated from the carbonylated proteins identified in all three biological replicates of the samples.

Table 2. 1. Examples of carbonylated proteins identified only in the control plant samples

AGI code	Protein name	Accession number	Molecular mass (kDa)	Localization	Peptide sequence	m/z	Charge	% coverage
A. Protein folding								
AT2G16600	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYP19-1)	Q38900	18.49	Cytosol	(R)IVMELYADTTPETAENFR(A) (K)FMCQGGDFTAGNGTGGESIYGSK(F) (K)HTGPGILSMANAGANTNGSQFFICTEK(T)	1050.50 1171.00 941.780	2 2 3	39
AT4G38740	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYP18-3)	P34790	18.37	Cytosol	(K)GVGGTGKPLHFK(G) (R)VIPNFMCGGDFTAGNGTGGESIYGSK(F) (K)HTGPGILSMANAGANTNGSQFFICTVK(T) (K)VGSSSGKPTKPVVVADCGQLS(-) (K)HVVFGQVVEGLDVVK(A)	1196.67 2763.23 2792.34 2072.06 1623.90	2 2 3 2 3	51
AT5G42980	Thioredoxin H3 (TRX3)	Q42403	13.11	Unassigned	(R)FIAPVFADLAK(K) (K)EGEIKETVVGA AK(E) (K)HLDVVFFK(V)	1190.67 1329.71 1003.55	2 2 2	20
AT5G49910	Heat shock 70 kDa protein 7 (HSP70-7)	Q9LTX9	77.00	Unassigned	(R)IINEPTAASLAYGFER(K) (R)VVDWLASTFK(K)	1750.89 1164.62	2 2	16
AT5G56030	Heat shock protein 81-2 (HSP81-2)	P55737	80.07	Unassigned	(K)TNNTLTIIDSGIGMTK(A) (K)HFSVEGQLEFK(A) (K)GIVDSEDLPLNISR(E) (K)EGQNDIFYITGESK(K) (R)APFDLFDTK(K)	1677.86 1319.65 1526.79 1599.74 1052.52	2 2 2 2 2	8

B. Detoxification									
AT1G19570	Glutathione S-transferase (DHAR1)	Q9FWR4	23.64	Unassigned	(K)AAVGAPDHLGDCPFSQR(A) (K)WVTDSDVIVGILEEK(Y) (K)TPAEFASVGSNIFGTFTFLK(S) (K)TLFSLDSFEK(T) (K)YVISGWAPK(V) (R)VSAVDLSLAPK(L)	1796.83 1701.89 2190.10 1185.59 1019.55 1098.63	2 2 2 2 2 2	35	
AT2G29450	Glutathione S-transferase U5 (GSTU5)	P46421	26.00	Cytosol	(K)LLGIWASPFSSR(R) (K)SPLLLALNPIHK(K)	1245.69 1314.80	2 2	10	
AT3G61440	Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase C1 (CYSC1)	Q9S757	39.93	Mitochondrion	(R)SFGAELVLTDPK(G) (K)EGLMVGISGANTVAAIR(L)	1346.71 1744.91	2 2	8	
C. Developmental process									
AT1G18080	Receptor for activated C kinase 1A (RACK1A)	O24456	35.75	Cytosol	(K)DVLSVAFSLDNR(Q) (R)FSPNTLQPTIVSASWDK(T) (R)STLAGHTGYVSTVAVSPDGSLCASGGK(D) (K)DGVVLLWDLAEGK(K) (K)DGVVLLWDLAEGKK(L)	1334.68 1889.95 2578.24 1413.75 1541.85	2 3 2 2 3	21	
AT2G21170	Triosephosphate isomerase (TIM)	Q9SKP6	33.35	Plastid	(R)IDISGQNSWVGK(G) (K)GGAFTGEISVEQLK(D) (K)WVILGHSER(R) (K)VASPQQAQEVHVAVR(G) (R)IYGGSVNGGNSAELAK(E)	1302.66 1434.74 1095.58 1617.86 1648.84	2 2 2 3 2	21	

AT2G42600	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2 (PPC2)	Q5GM68	109.76	Cytosol	(K)VSEDDKLIEYDALLDR(F) (R)FLDILQDLHGEDVR(E) (K)NQTVDLVLTAHPTQSVR(R) (R)HSDVLDAITTHLGIGSYK(E) (K)LADLESAPAAVAR(L) (R)GGGPTHLAISQPPDTIHGQLR(V) (K)DITPDDKQELDEALQR(E)	2006.02 1668.85 1877.99 1925.99 1282.69 2264.20 1884.91	3 3 2 3 2 4 2	12
AT2G43750	Cysteine synthase (OASB)	P47999	41.66	Plastid	(K)SVLVESTSGNTGIGLAFIAASK(G) (K)IHYETTGPFIWEDTR(G) (R)GKIDILVAGIGTGGTITGVGR(F) (K)IDILVAGIGTGGTITGVGR(F) (R)AFGAELVLTEPAK(G) (K)IQGIGAGFVPK(N)	2122.14 1845.86 1954.12 1769.01 1344.73 1085.63	2 2 2 2 2 2	15
D. Small molecule binding								
AT1G24020	MLP-like protein 423 (MLP423)	Q93VR4	17.05	Unassigned	(K)FWVALGDGINLFPK(A) (K)TIQVLAGDGNAPGSIR(L) (R)LITYGEGSPLVK(I) (K)TAHEIDDPHVIK(D)	1575.85 1567.83 1275.71 1373.69	2 2 2 2	27
AT1G76030	V-type proton ATPase subunit B1 (VHA-B1)	P11574	54.11	Unassigned	(R)TVSGVAGPLVILDK(V) (K)AVVQVFEGTSGIDNK(F) (R)TYPEEMIQTGISTIDVMNSIAR(G) (R)QIYPPINVLPSLSR(L) (K)FVMQGAYDTR(N) (R)IALTTAEYLAIECGK(H)	1367.80 1562.80 2468.17 1595.91 1186.54 1701.83	2 2 2 2 2 2	13
AT2G26080	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 2 (GLDP2)	O80988	113.78	Mitochondrion	(K)FSGIFDEGLTESQMIEHMSDLASK(N) (K)FSGIFDEGLTESQMIEHMSDLASK(N) (K)LGTAQVQDLPPFDTVK(V) (K)VTCSDATAIFDVA AK(K) (R)IIGVSVDSSGK(Q) (R)VHGLAGVFALGLK(K)	2671.22 1060.58 1777.93 1567.76 1060.58 1280.76	3 2 2 2 2 2	15

AT3G59970	Methylenetetrahydrofolate reductase 1 (MTHFR1)	Q9SE60	66.29	Cytosol	(K)IDHALETIR(S) (R)SNGIQNVLALR(G) (K)SDSPAIGWGGPGGYVYQK(A) (K)SENWVSNTGESDVNAVTVWGVFPAK(E) (K)EVIQPTIVDPASFK(V) (K)LQQEWVVPLK(S)	1066.58 1183.67 1837.86 2593.61 1542.83 1238.70	3 2 2 2 2 2	13
AT4G18480	Magnesium-chelatase subunit Chl1-1 (CHL1)	P16127	46.27	Plastid	(K)INMVDLPLGATEDR(V) (R)FGMHAQVGTVR(D) (R)FILIGSGNPEEGELRPQLLDR(F) (R)VCSELNVDGLR(G)	1542.77 1201.60 2352.25 1260.62	2 3 3 2	10
AT5G62790	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR)	Q9XFS9	51.97	Plastid	(R)VVALAAGSNVTLLADQVR(R) (R)HPEAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGK(D) (K)ETLIAGGPFVLPLANK(H) (R)LPILYTMSWPDR(V) (R)AGGTMTGVLSAANEK(A)	1796.02 2744.49 1638.94 1490.76 1405.69	2 3 2 2 2	19
E. Oxidoreductase activity								
AT4G21280	Oxygen-evolving enhancer protein 3-1 (PSBQ1)	Q9XFT3	23.87	Plastid	(K)DIINVKPLIDR(K) (R)KAWPYVQNDLR(S) (K)AWPYVQNDLR(S) (R)YDLNTIISPK(D) (K)LFDTIDNLDYAAK(K)	1294.76 1388.72 1260.63 1377.75 1497.74	3 2 2 3 2	21
AT4G25130	Peptide methionine sulfoxide reductase A4 (MSR4)	P54150	28.64	Plastid	(K)TEVGYSHGIVHNPSYEDVCTGTTGHNEVVR(V) (R)SGIYYTDEQER(I)	3313.51 1522.66	4 2	16
ATCG00280	Photosystem II CP43 reaction center protein (PSBC)	P56778	51.87	Plastid	(R)DQETTGF AWWAGNAR(L) (K)ALYFGGVYDTWAPGGGDVR(K) (R)LGANVGSAQGPTGLGK(Y) (R)SPTGEVIFGGETMR(F) (R)SAEYMT HAPL GSLNSVGGVATEINAVNYVSPR(S)	1708.76 1999.95 1425.76 1479.70 3303.63	2 2 2 2 3	20

ATCG00680	Photosystem II CP47 reaction center protein (PSBB)	P56777	56.04	Plastid	(R)AGSMDNGDGIavgwlgHPVFR(N) (R)MPTFFETFPVVLVDGDGIVR(A) (K)LAFYDYIGNNPAK(G)	2171.02 2238.14 1484.73	3 2 2	8
F. Transferase activity								
AT1G16880	ACT domain-containing protein (ACR11)	Q9FZ47	31.30	Plastid	(R)LGALLDTMNALK(N) (K)NLGLNVVK(A) (R)KVEDPELLEAIR(L) (K)ALIKPLQQVLANSR(Y) (R)SLLFIESADRPGLLVELVK(I)	1258.70 855.520 1410.77 1663.02 2098.20	2 2 3 3 2	16
AT5G19220	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1 (ADG2)	P55229	57.68	Plastid	(R)TVASIILGGGAGTR(L) (K)AMAVDTTILGLSK(E) (R)SGITVILK(N)	1271.72 1318.72 829.530	2 2 2	7
ATCG00830	50S ribosomal protein L2 (rpl2-A)	P56791	29.87	Unassigned	(R)GAIIGDTIVSGTEVPIK(M) (K)NCSATVGQVGNVGVNQK(S) (K)KPVTPWGYPALGR(R)	1668.93 1730.84 1440.79	2 2 2	17

Table 2. 2. Examples of carbonylated proteins identified only in H₂O₂-treated plant samples

AGI code	Protein name	Accession number	Molecular mass (kDa)	Localization	Peptides sequence	m/z	Charge	% coverage
A. Response to external stimulus								
AT1G37130	Nitrate reductase [NADH] 2 (NIA2)	P11035	102.85	Cytosol	(R)LEPGLNGVVR(S) (K)HPFNSEAPLNR(L) (R)IIPGFIGGR(M) (K)ESDNFYHFK(D) (R>NLALVNPR(A) (R>FALPVEDMVLGLPVGK(H) (K)VWYVVESAK(E) (R>DIILAYMQNGEYLTPDHGFPVR(I) (K>GEIGIVFEHPTLPGNESGGWMAK(E)	1052.60 1280.63 1041.63 1185.51 895.520 1699.92 1079.57 2548.24 2425.17	2 2 2 2 2 2 2 3 3	8
AT1G80600	Acetylornithine aminotransferase (WIN1)	Q9M8M7	48.83	Plastid/ Mitochondrion	(R>VFFCNSGTEANEAIAIK(F) (K>IAAVFVEPIQEGGGIYSATK(E) (R>SACDAAGSLLVFDEVQCGLGR(T) (R>DSGLLILTAGK(G) (R>IVPPLVISEEEIER(A) (K>EYLDGASGIAVNALGHGDPDWLR(A) (K>VIVGTYAR(A)	1756.81 2049.08 2224.03 1086.63 1621.90 2528.18 877.50	2 2 2 2 2 3 2	18
AT2G37220	RNA-binding protein CP29B	Q9ZUU4	30.72	Plastid	(K>EQSFSADLK(L) (R>SSFGSSSGSYGGGGGSGAGSGNR(V) (K>GFGFVTYDSSQEVQNAIK(S) (K>SLDGADLDGR(Q)	1023.49 1905.78 1988.95 1017.47	2 2 3 2	21
AT3G01480	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38	Q9SSA5	47.98	Plastid	(K>SIIVAGFAESK(K) (R>SDGFVVQTDPEGPAEGFIDPSTEK(T) (R>TVPLEIMVTGEK(T) (R>IVLDGYNAPVTAGNFVDLVER(H)	1120.61 2578.17 1315.71 2261.17	2 2 2 2	11

AT4G03280	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit (PETC)	Q9ZR03	24.37	Plastid	(K)DALGNDVVAAEWLK(T) (K)GDPTYLVVENDK(T) (K)FLPCHGSQYNAQGR(V) (R)GPAPLSLALAHADIDEAGK(V) (K)VLFVPWVETDFR(T)	1499.76 1348.65 1793.77 1844.97 1506.79	2 2 3 3 2	26
AT4G37930	Serine hydroxymethyl-transferase 1 (SHM1)	Q9SZJ5	57.40	Mitochondrion	(R)YYGGNEYIDMAETLCQK(R) (R)LDESTGYIDYDQMEK(S) (K)SATLFRPK(L) (K)LIVAGASAYAR(L) (K)VLEAVHIASNK(N) (R)GFVEEDFAK(V) (K)LRHEVEEFAK(Q) (K)QFPTIGFEK(E) (K)AYQEQVLSNSAK(F) (K)GLELIPSENFTSVSVMQAVGSVMTNK(Y) (K)ISAVSIFSETMPYR(L) (K)AYQEQVLSNSAK(F) (K)LKDFVSAMESSTIQSEIAK(L)	2053.88 1805.77 918.530 1090.61 1179.66 1040.48 1256.65 1065.55 1336.66 2737.37 1659.84 1336.66 2170.08	2 2 2 2 2 2 2 2 3 2 2 3	21
AT4G39260	Glycine-rich RNA-binding protein 8 (RBG8)	Q03251	16.58	Nucleus	(R)CFVGGLAWATNDEDLQR(T) (R)TFSQFGDVIDSK(I) (R)GFGFVTFK(D) (R)GFGFVTFKDEK(A) (R)VITVNEAQRS(G) (R)SGGGGGYSGGGGGYSGGGGGYER(R)	1950.89 1342.64 901.47 1273.64 1115.59 2022.80	2 2 2 2 2 2	44
AT5G08280	Porphobilinogen deaminase (HEMC)	Q43316	41.05	Plastid	(R)GSPLALAQAYETR(E) (K)ILSQPLADIGGK(G) (K)TILPCNLPR(E) (K)VQATLLALAGLK(R) (R)AFLETLDGSCR(T) (R)TPIAGYASK(D) (K)DAGQELLSR(A)	1375.71 1210.69 1082.59 1196.75 1267.59 906.48 987.50	2 2 2 2 2 2 2	20

B. Catabolic process								
AT1G32470	Glycine cleavage system H protein 3 (GDH3)	Q9LQL0	17.90	Mitochondrion	(K)YANSHEWVK(H) (K)LTESPLINSSPYEDGWMIK(V)	1132.53 2252.07	2 2	17
AT1G43670	Fructose-1,6-bisphosphatase (CYFBP)	Q9MA79	37.2881	Cytosolic	(K)LIGLAGETNIQGEEQK(K) (K)LIGLAGETNIQGEEQKK(L) (R)TSVLVSEEDDEEATFVEPSKR(G) (K)GNIYSVNEGNAQNWDGPTTK(Y) (R)YVGSMVADVHR(T) (R)SPIFLGSYDDVEEIK(A) (R)TLLYGGIFLYPADK(K) (R)TLLYGGIFLYPADKK(S)	1698.88 1826.98 2251.09 2163.98 1232.60 1710.84 1569.85 1697.94	2 3 3 2 3 2 2 2	24
AT3G46970	Alpha-glucan phosphorylase 2 (PHS2)	Q9SD76	95.16	Cytosolic	(K)ANPEADDATEIAGNIVYHAK(Y) (K)QTYYLSMEYLQGR(A) (K)TVAYTNHTVLPEALEK(W) (R)ALTNAIGNLNLQGPYADALR(T) (K)WITDLDLLTGLR(Q) (R)VTGVSIDPTSLFDIQVK(R)	2098.00 1666.77 1784.93 2084.10 1414.78 1817.98	2 2 2 2 2 2	6
C. Detoxification								
AT5G06290	2-Cys peroxiredoxin BAS1-like (2-Cys Prx B)	Q9C5R8	29.78	Plastid	(K)SGGLGDLNYPLVSDITK(S) (K)SFGVLIPDQGIALR(G) (K)EGVIQHSTINNLGIGR(S)	1747.90 1484.84 1706.91	2 2 3	17
AT5G43940	S-(hydroxymethyl) glutathione dehydrogenase (HOT5)	Q96533	40.70	Cytosol	(K)AAVAYEPNKPLVIEDVQVAPPQAGEVR(I) (K)KFGVNEFVNPK(D) (K)FGVNEFVNPK(D) (K)GTAFFGGFK(S) (K)VDEYITHNLTLGEINK(A) (K)VCLLGCGVPTGLGAVWNTAK(V)	2859.51 1277.68 1149.58 783.39 1857.95 2072.06	3 3 2 2 3 2	21

					(K)VEPGSNVAIFGLGTVGLAVAEGAK(T) (R)IIGIDIDSK(K) (K)ILYTALCHTDAYTWSGK(D)	2255.22 972.55 1998.95	2 2 3	
D. Anatomical structure development								
AT4G29350	Profilin-2 (PRO2)	Q42418	13.9978	Cytosol	(K)DFEEAGHLAPTGLFLGGEK(Y) (K)YMVVQGEAGAVIR(G)	1986.97 1407.72	3 2	24
AT5G24300	Starch synthase (SS1)	Q9FNF2	72.10	Plastid	(K)SYHRPGNPNYGDSK(G) (R)ITAGCDILLMPSR(F) (R)FEPCLNQLYAMR(Y) (R)YGTIPVVHGTGGLR(D) (R)GWVGFNVPISHR(I) (K)TGGLGDVCGSLPIALAGR(G)	1476.68 1461.73 1613.73 1425.77 1367.71 1712.89	2 2 2 2 3 2	8
E. Structural constituent of ribosome								
AT1G05190	50S ribosomal protein L6 (RPL6)	O23049	24.71	Plastid	(K)GPLGELALTYPR(E) (R)EVELTKEESGFLR(V) (R)ANQMHGLFR(T) (R)TLTDNMVVGVS(K) (K)LILVGVGYR(A) (R)ITVSGYDK(S) (K)SEIGQFAATVR(K) (K)ELVLNLGFSHPVK(M)	1285.70 1535.78 1088.52 1262.66 988.61 881.45 1177.61 1451.81	2 3 2 2 2 2 2 2	33
AT2G27710	60S acidic ribosomal protein P2-2 (RPP2B)	Q9SLF7	11.44	Cytosol	(K)GKDLAELIAAGR(E) (K)DLAELIAAGR(E) (K)LASVPSGGGGVAVASATSGGGGGG GASAAESK(K) (K)VVAAYLLAVLSGK(A)	1212.68 1027.57 2587.25 1302.79	2 2 3 2	39
AT3G27830	50S ribosomal proteinL12-1 (RPL12A)	P36210	20.08	Plastid	(K)IGSEISLTLEEAR(I) (R)ALTSLALK(E) (K)ELIEGLPK(K)	1503.78 815.51 897.52	2 2 2	16

AT5G27850	60S ribosomal protein L18-3 (RPL18C)	Q940B0	20.97	Cytosol	(R)SNSNFNAVILK(R) (R)APLGQNTVLLR(G) (K)HFGPAPGVPHSNTKPYVR(H) (K)IAVLVGTITDDL(R)	1205.64 1180.69 1960.01 1384.79	2 2 3 2	21
F. Lyase activity								
AT2G05710	Aconitate hydratase 3 (ACO3)	Q9SIB9	108.20	Mitochondrion	(R)ILLES(AIR(N) (K)TSLAPGSGVVTK(Y) (R)SNLVGMGIPLCFK(S) (K)SGEDADTLGLTGH(Y)	913.56 1115.62 1563.82 1556.71	2 2 2 2	6
AT5G11670	NADP-dependent malic enzyme 2 (NADP-ME2)	Q9LYG3	64.41	Cytosol	(R)DAHLYLTGLLPPVILSQDVQER(K) (R)ILGLGDLGCQGMGIPVGK(L) (K)DLIGAVNAIKPTVLIGTSGVGGQTFTK(E) (R)AIFGSGSPFDPVVYDYGK(T) (K)TYDLGLASNLPR(A) (K)FAESSMYSPPVYR(N)	2363.23 1783.94 2599.46 1754.85 1318.69 1435.65	3 2 3 2 2 2	13
AT5G38430	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1B (RBCS-1B)	P10796	20.29	Plastid	(R)QVQCISFIAYKPPSFTDA(-) (K)FETLSYLPDLTDVELAK(E)	2071.01 1953.00	2 2	49
G. Carbohydrate derivative binding								
AT1G19920	ATP sulfurylase 2 (APS2)	Q43870	53.64	Plastid	(R)EDEYLQSLHFNSLR(L) (K)NPVLLHPLGGFTK(A) (K)EFLFISGTK(M)	1749.84 1504.88 1040.56	2 2 2	10
AT3G22890	ATP sulfurylase 1 (APS1)	Q9LIK9	51.46	Plastid	(R)LDDGSVVNMSVPIVLAIDDEQK(A) (R)VALFNSDGNPVAILSDIEIYK(H) (R)INAGANFYIVGR(D) (R)NPVHNGHALLMTDTR(R) (K)NPILLHPLGGFTK(A)	2356.18 2277.19 1293.68 1690.82 1518.89	2 2 2 3 2	12

AT4G09320	Nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK1)	P39207	16.50	Unassi- gned	(R)GLIGEVICR(F)	1015.55	2	32
					(R)KIIGATNPAASEPGTIR(G)	1694.93	2	
					(K)IIGATNPAASEPGTIR(G)	1566.84	2	
					(R)GDFAIDIGR(N)	962.48	2	
					(R)NVIHGSDSVESAR(K)	1369.66	2	

2.6.3. Exogenous H₂O₂ mostly targets proteins involved in defense-related processes for carbonylation

To determine the biological processes and molecular functions overrepresented in the lists of carbonylated proteins in response to exogenous H₂O₂, we performed a gene ontology (GO) enrichment analysis by using the ShinyGO v0.76 online tool. The carbonylated proteomes derived from the untreated plants and the H₂O₂-treated plants were found to be enriched in different biological processes (**Figure 2.3**). Notably, the carbonylated proteins identified in the samples of untreated plants were enriched in the processes of photosynthesis (GO: 0015979) and generation of metabolic precursors and energy (GO: 0006091), whereas, the carbonylated proteins identified in the samples of H₂O₂-treated plants were distinctively enriched in processes related to the immune system response including defense response to other organism (GO: 0051707), interspecies interaction between organisms (GO: 0044419), and external biotic stimulus (GO: 0043207). Concerning the molecular functions, the carbonylated proteins in the control samples were mostly related to the electron transporter, transferring electrons within the cyclic electron transport pathway of photosynthesis activity (GO: 0045156), cysteine synthase activity (GO: 0004124), Cyclosporin A binding (GO: 0016018), chlorophyll binding (GO: 0016168), and oxidoreductase activity acting on a sulfur group of donors, disulfide as acceptor (GO: 0016671). In contrast, the carbonylated proteins in the H₂O₂-treated samples were mostly related to amidophosphoribosyltransferase activity (GO: 0004044), sulfate adenylyltransferase (ATP) activity (GO: 0004781), adenylylsulfate kinase activity (GO: 0004020), poly-pyrimidine tract binding (GO: 0008187), and oxidoreductase activity acting on other nitrogenous compounds as donors (GO: 0016661).

We also determined the subcellular localization of the carbonylated proteins identified in the two groups of samples by using the Subcellular localization database for *Arabidopsis* proteins SUBA (<https://suba.plantenergy.uwa.edu.au>; Hooper et al., 2017; **Figure 2.4**). The carbonylated proteins found in the control samples were assigned in the cytosol (26%), plastids (23%), mitochondria (5%), and a significant proportion of proteins with unassigned localization (46%). In comparison, the proportion of unassigned carbonylated proteins was relatively low (23%) in the samples of H₂O₂-treated plants, and

2% of the carbonylated proteins in the samples of H₂O₂-treated plants were assigned in the nucleus (2%).

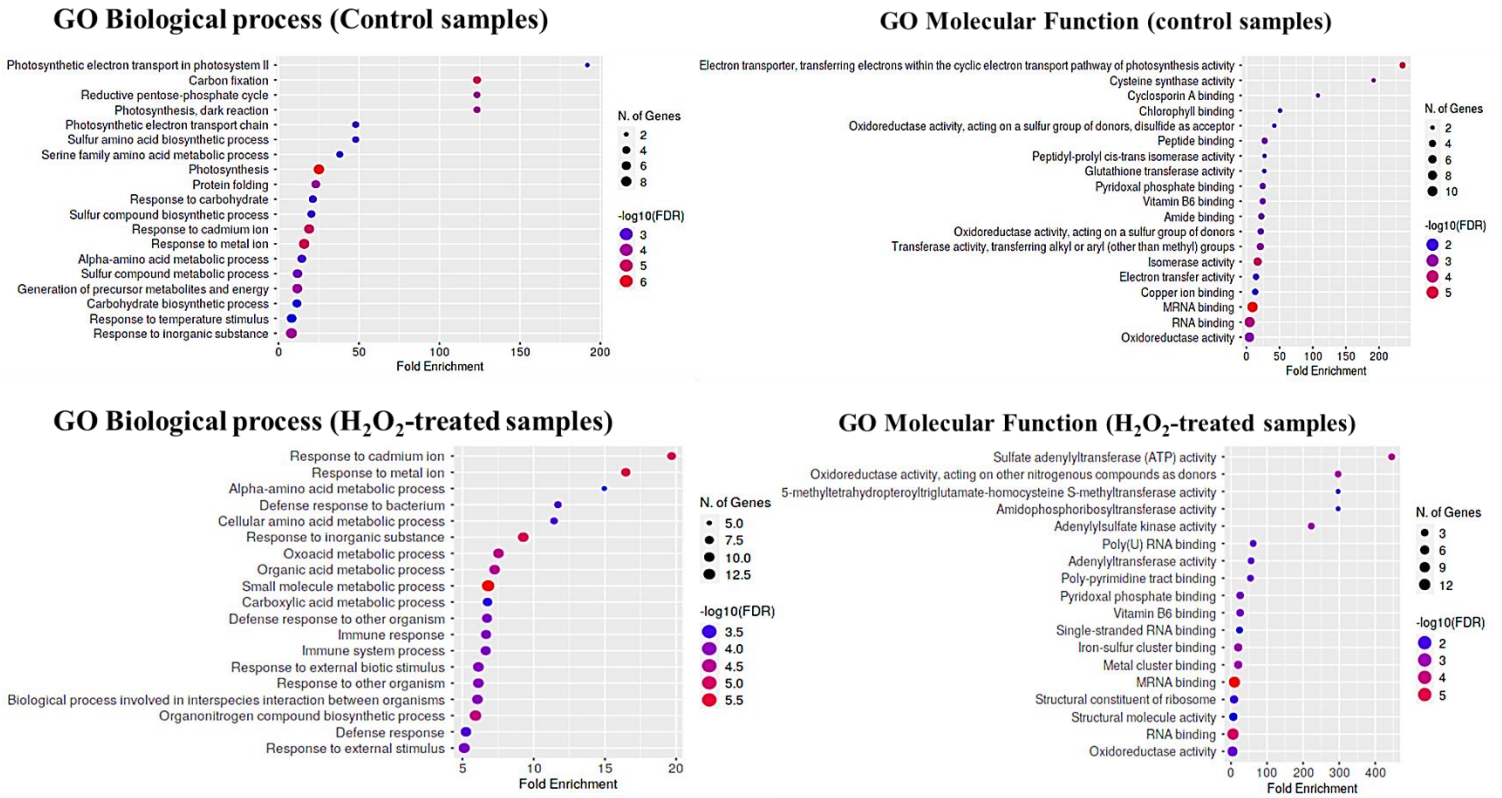


Figure 2. 3. Gene ontology enrichment analysis. The bubble chart of the top 20 Gene Ontology (GO)-terms represented by the carbonylated proteins in the control plant samples (T0) and H₂O₂-treated plant samples (T20) were generated using the ShinyGO v0.76 web-based bioinformatics resource. The x-axis indicates fold enrichment. The y-axis indicates GO terms.

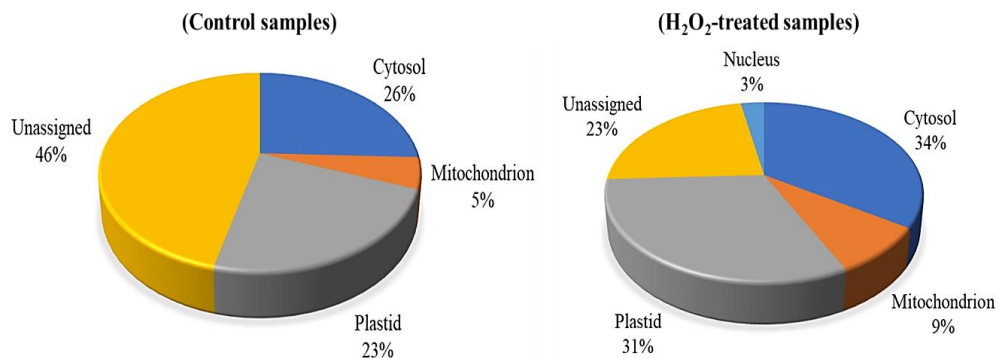


Figure 2. 4. Predicted sub-cellular localization of the carbonylated proteins. The subcellular localization of the carbonylated proteins in the control samples and the H₂O₂-treated samples were compared by using the Subcellular Proteomic Database SUBA.

2.6.4. H₂O₂-induced protein carbonylation targets the interaction between proteins of the chloroplast redox systems, sulfur metabolism, and translation

Because carbonylation can affect physical interactions between individual proteins we next probed the extent to which the carbonylated proteome data mapped onto *A. thaliana* protein-protein interaction (PPI) data. A functional network analysis was performed on the carbonylated proteins induced by H₂O₂ on the STRING server (Szklarczyk et al., 2021). We limited the sources of information to build the network to only experimentally determined interactions, curated databases, and coexpression data. After removing disconnected nodes, 3 major clusters (PPI enrichment p-value: < 1.0e-16) were revealed within the query list of proteins via the MCL clustering algorithm (**Figure 2.5**). The cluster 1 is dominated by chloroplast proteins with oxidoreductase activity and involved in photosynthesis, defense to bacterium and oxidation-reduction processes. The cluster 2 contains proteins mostly related to sulfur metabolism. This cluster also contains the 14-3-3 PROTEIN G-BOX FACTOR14 KAPPA (GRF8), a 14-3-3 family protein associated with a DNA binding complex that binds to the G box, a well-characterized cis-acting DNA regulatory element found in plant genes. GRF8 was shown to be involved in the regulation of nutrient metabolism and acting as a negative regulator of freezing tolerance that modulates cold-responsive C-repeat-binding factors (CBF) DREB1A and DREB1B proteins stability by facilitating their ubiquitin-mediated degradation. The cluster 3 was dominated by cytosolic proteins involved in mRNA binding and protein translation. Changing the default settings to add up to 50 interacting proteins did not generate additional cluster, but merely increased the number of genes in the cluster 3 with ribosome proteins. This underscored the potential impact of H₂O₂-induced protein carbonylation on the chloroplast redox systems, the sulfur metabolism, translation, and protein homeostasis.

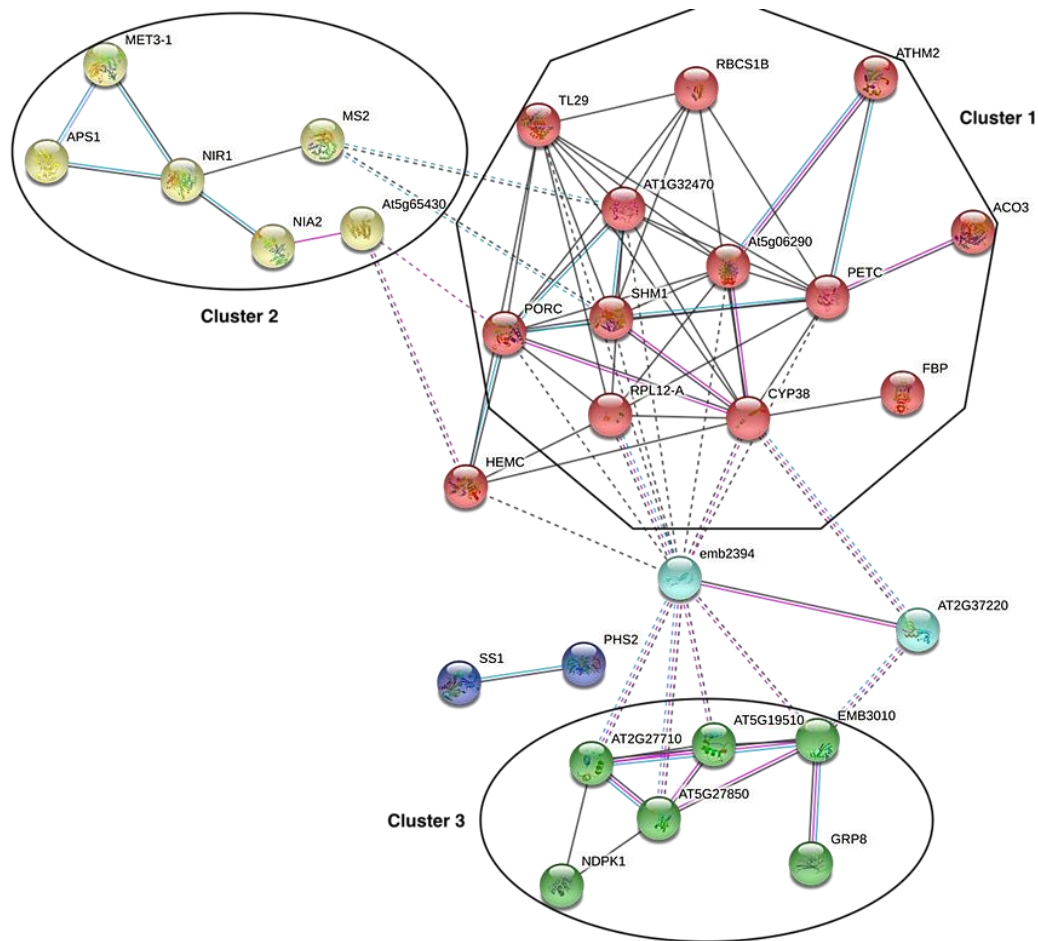


Figure 2. 5. Protein-protein interaction networks inferred from the carbonylated proteins. The network was generated from the STRING server by projecting the list of the H₂O₂-induced carbonylated proteins onto *A. thaliana* protein-protein interaction (PPI) data and by using only experimentally determined interactions, curated databases, and coexpression data with default settings. PPI enrichment p-value: < 1.0e-16.

2.7. Discussion

Protein carbonylation is one of the post-translational modifications (PTM) induced by H₂O₂ and reactive electrophile aldehydes and ketones, but the biological processes that are targeted are less defined. Whether it contributes to the intracellular signaling by H₂O₂ also remained to be clarified further. In this study, we investigated proteins of which activity could be affected by carbonylation induced by exogenous H₂O₂ in *A. thaliana* plants. Like protein carbonylation, protein sulphenylation is also induced by H₂O₂ under stress conditions and occurs on reactive cysteines (Huang et al., 2019; Yu et al., 2021). The activity of numerous ROS-generating enzymes and signaling proteins was shown to be

controlled by sulphenylation (Waszczak et al., 2014; Waszczak et al., 2015), suggesting that protein carbonylation may also control the activity of certain proteins for physiological purposes. In this study, we sprayed the leaves of 21-day-old plants with solutions of 1 and 20 mM of H₂O₂ and examined the proteins that became carbonylated thereafter in the leaves. Similar or higher concentrations of H₂O₂ were previously used to identify the genes regulated by H₂O₂ in transcriptome studies (Dietz et al., 2006; Gadjev et al., 2006). The levels of H₂O₂, MDA, and catalase activity that we quantified from the leaves confirmed that the concentration of 20 mM H₂O₂ was sufficient to induce MDA and H₂O₂ formation *in vivo*, both of which can lead to protein carbonylation in *A. thaliana* (Noctor et al., 2015; Missihoun and Kotchoni, 2017; Morales and Munné-Bosch, 2019; Ciacka et al., 2020). Catalase is an enzyme involved in the detoxification of H₂O₂ (Dietz et al., 2006; Gadjev et al., 2006), and MDA is known to be an unconditional marker of stress (Missihoun and Kotchoni, 2017; Morales and Munné-Bosch, 2019). At a concentration of 1 mM, exogenous H₂O₂ did not affect the level of carbonylation of proteins in the leaves, whereas at 20 mM, it increased the fluorescence signal of labeled carbonylated proteins. Moreover, we observed that the level of carbonylation of certain proteins was greater in the samples treated with H₂O₂ compared to the control samples (**Figure 2.1**). This indicated that the application of H₂O₂ could lead to selective carbonylation of some proteins, certainly those bearing hyperreactive cysteines (Weerapana et al., 2010). Our approach was qualitative, and therefore, does not allow to state which proteins changed in abundance upon the treatment. Detection of modified proteins in our analyses may be driven in part by abundance in the proteome, and peptides from high abundance proteins could be more easily detected by LC-MS/MS than those from low-abundance proteins. A few carbonylated proteins identified in previous studies in response to salt stress or ABA were also found in this study. These include the Glycine-rich RNA-binding protein 8 (AT4G39260) (Mano et al., 2014), and ASCORBATE PEROXIDASE4 (APX4 or TL29, AT4G09010) and 2-cys-peroxiredoxin BAS1-like 2 (2-Cys PRXB, AT5G06290) (Jaballi and Missihoun, 2022). Because salt stress induces oxidative stress and ABA and there is a crosstalk between ABA and H₂O₂ signaling pathways, it is likely that these three proteins are at the crossroads of the plant's response pathways to ABA and H₂O₂. For what we know, APX4 encodes a thylakoid lumen protein associated with the photosystem II but

with no proved ascorbate peroxidase activity (Granolund et al., 2009). It was shown to regulate seed vigor and seedling growth in *A. thaliana* (Wang et al., 2014). 2-Cys PRXs are plastid proteins encoded by two genes (2-Cys PRXA and 2-Cys PRXB) in *A. thaliana*. They were recently shown to be part of a redox-sensitive module including cyclophilin 20-3 and cysteine synthase, which integrates sulfur metabolism and oxylipin signaling in the high light acclimation responses (Müller et al., 2017). The 2-Cys PRX would specifically control photosynthesis, sugar, and amino acid metabolism (Müller et al., 2017). The 2-Cys PRX were also shown to be involved in light-dark redox homeostasis and signaling (Dangoor et al., 2012; Yoshida et al., 2018). In leaves, these abundant PRXs represent ~1% of chloroplast proteins and possess diverse activities. Depending on their oxidation and oligomerization states, peroxidase activity, chaperone activity, and transmitter of redox signals were attributed to the two chloroplast 2-Cys PRX in *A. thaliana* (D'Autréaux and Toledano, 2007; Poole et al., 2011; Cerveau et al., 2016; Liebthal et al., 2018). S-nitrosylation, phosphorylation, Cys-glutathionylation, and Lys-acetylation are previously reported PTMs of PRXs, which, in turn, alter PRX properties (Liebthal et al., 2018). The biological importance of the PRXs carbonylation remains to be elucidated. We looked for the information about the residues involved in the carbonylation of these proteins but with limited success. The information was obtained for only a limited number of proteins except the 2-Cys PRXs (**Supplementary Table 2.4**). Besides these proteins, our results indicated that exogenous H₂O₂ triggered the carbonylation of a set of proteins and enzymes involved in defense response, chloroplast redox systems, sulfur and protein metabolism (**Tables 2.1 and 2.2**). AtGRP8 (RBG8) is one of these proteins and is located in the nucleus. GRP8 is a glycine-rich RNA-binding protein that plays a role in RNA processing during stress (Streitner et al., 2012). It is involved in mRNA alternative splicing of numerous targets by modulating splice site selection. Its carbonylation in response to H₂O₂ suggests that it has a carbonylation-sensitive residue, and we speculate that the carbonylation of AtGRP8 might serve as a node of transcriptional regulation by H₂O₂. A targeted proteomics approach on the proteins identified in this study will likely be more meaningful in elucidating the biological importance of their carbonylation. Overall, this study showed that exogenous H₂O₂, from a certain threshold, (i) increased the intracellular levels of H₂O₂ and MDA, and concomitantly, (ii) induced the carbonylation of certain proteins. H₂O₂ can

activate in one case the vital physiological mechanisms linked to the growth and development of the plant, and in the other case, it can trigger processes leading to the death of the cell and even of the plant (Černý et al., 2018). The role that carbonylated proteins may play in either case in plant tissues remains poorly understood. Although the analysis showed different carbonylated proteins in each sample, it remains to demonstrate the impact of this change on these proteins and the plant. This will be the subject of our investigations in the future. The identification and experimental validation of the sites of carbonylation are required to investigate the consequence of the carbonylation on the protein function. The H₂O₂-induced carbonylated proteins that we identified in this study constitute a list of candidate proteins for future investigations about the importance of protein carbonylation in H₂O₂ signaling and hormesis effects.

2.8. Data availability statement

The data presented in the study are deposited in the ProteomeXchange repository, accession number PXD037515. This is the link: <http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=PXD037515>.

2.9. Funding

This research was funded through the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grant Program, grant number DGEGR-2019-00304 to Tagnon D. Missihoun.

2.10. Acknowledgments

Georges Y. Fangué-Yapseu and Tola Adesola Julius thanks UQTR for the financial support through the UQTR Foundation scholarships.

2.11. Conflict of interest

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

2.12. Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

2.13. References

- Biswas, M. S., Fukaki, H., Mori, I. C., Nakahara, K., and Mano, J. (2019). Reactive oxygen species and reactive carbonyl species constitute a feed-forward loop in auxin signaling for lateral root formation. *Plant J.* 100, 536-548. doi: 10.1111/tpj.14456
- Bollineni, R. C., Fedorova, M., and Hoffmann, R. (2013). Qualitative and quantitative evaluation of derivatization reagents for different types of protein bound carbonyl groups. *Analyst* 138, 5081-5088. doi: 10.1039/C3AN00724C
- Černý, M., Habánová, H., Berka, M., Luklová, M., and Brzobohatý, B. (2018). Hydrogen peroxide: Its role in plant biology and crosstalk with signalling networks. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (9), 2812. doi: 10.3390/ijms19092812
- Cerveau, D., Ouahrani, D., Marok, M. A., Blanchard, L., and Rey, P. (2016). Physiological relevance of plant 2-cys peroxiredoxin overoxidation level and oligomerization status. *Plant Cell Environ.* 39, 103-119. doi: 10.1111/pce.12596
- Chance, B., and Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764-775. doi: 10.1016/S0076-6879(55)02300-8
- Chavez, J., Wu, J., Han, B., Chung, W.-G., and Maier, C. S. (2006). New role for an old probe: Affinity labeling of oxylipid protein conjugates by n'-aminooxymethylcarbonylhydrazino d-biotin. *Anal. Chem.* 78, 6847-6854. doi: 10.1021/ac0607257
- Ciacka, K., Tymiński, M., Gniazdowska, A., and Krasuska, U. (2020). Carbonylation of proteins—an element of plant ageing. *Planta* 252, 12. doi: 10.1007/s00425-020-03414-1
- Curtis, J. M., Hahn, W. S., Long, E. K., Burrill, J. S., Arriaga, E. A., and Bernlohr, D. A. (2012). Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 399-406. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.008
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., and Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 52, 601-623. doi: 10.1373/clinchem.2005.061408

- Dangoor, I., Peled-Zehavi, H., Wittenberg, G., and Danon, A. (2012). A chloroplast light-regulated oxidative sensor for moderate light intensity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 1894-1906. doi: 10.1105/tpc.112.097139
- D'Autréaux, B., and Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 813-824. doi: 10.1038/nrm2256
- Dietz, K. J., Jacob, S., Oelze, M. L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S. M. N., et al. (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J. Exp. Bot.* 57, 1697-1709. doi: 10.1093/jxb/erj160
- Fedorova, M. (2017). "Diversity of protein carbonylation pathways: Direct oxidation, glycooxidation, and modifications by lipid peroxidation products," in *Protein carbonylation: Principles, analysis, and biological implications*. (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.) 48-82. doi: 10.1002/9781119374947.ch3
- Fedorova, M., Bollineni, R. C., and Hoffmann, R. (2014). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass. Spectromet. Rev.* 33, 79-97. doi: 10.1002/mas.21381
- Fritz, K. S., and Petersen, D. R. (2011). Exploring the biology of lipid peroxidation-derived protein carbonylation. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1411-1419. doi: 10.1021/tx200169n
- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T. S., Laloi, C., Minkov, I. N., Shulaev, V., et al. (2006). Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141, 436-445. doi: 10.1104/pp.106.078717
- Granlund, I., Storm, P., Schubert, M., García-Cerádñ, J. G., Funk, C., and Schröder, W. P. (2009). The TL29 protein is lumen located, associated with psII and not an ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 50, 1898-1910. doi: 10.1093/pcp/pcp134
- Heath, R. L., and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. i. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189-198. doi: 10.1016/0003-9861(68)90654-1
- Hooper, C. M., Castleden, I. R., Tanz, S. K., Aryamanesh, N., and Millar, A. H. (2017). SUBA4: The interactive data analysis centre for *Arabidopsis* subcellular protein locations. *Nucleic Acids Res.* 45, D1064-D1074. doi: 10.1093/nar/gkw1041
- Huang, J., Willems, P., Wei, B., Tian, C., Ferreira, R. B., Bodra, N., et al. (2019). Mining for protein s-sulfenylation in *Arabidopsis* uncovers redox-sensitive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 21256-21261. doi: 10.1073/pnas.1906768116
- Islam, M. M., Ye, W., Akter, F., Rhaman, M. S., Matsushima, D., Munemasa, S., et al. (2020). Reactive carbonyl species mediate methyl jasmonate-induced stomatal closure. *Plant Cell Physiol.* 61, 1788-1797. doi: 10.1093/PCP/PCAA107

- Islam, M. M., Ye, W., Matsushima, D., Munemasa, S., Okuma, E., Nakamura, Y., et al. (2016). Reactive carbonyl species mediate ABA signaling in guard cells. *Plant Cell Physiol.* 57, 2552-2563. doi: 10.1093/pcp/pcw166
- Jaballi, A., and Missihoun, T. D. (2022). The phytohormone abscisic acid modulates protein carbonylation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 174, e13658. doi: 10.1111/ppl.13658
- Jaisson, S., Desmons, A., Gorisse, L., and Gillery, P. (2017). Protein molecular aging: Which role in physiopathology? *Medecine/Sciences* 33, 176-182. doi: 10.1051/medsci/20173302013
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. doi: 10.1038/227680a0
- Liebthal, M., Maynard, D., and Dietz, K. J. (2018). Proxiredoxins and redox signaling in plants. *Antioxid. Redox Signaling* 28, 609-624. doi: 10.1089/ars.2017.7164
- Mano, J., Nagata, M., Okamura, S., Shiraya, T., and Mitsui, T. (2014). Identification of oxidatively modified proteins in salt-stressed arabidopsis: a carbonyl-targeted proteomics approach. *Plant Cell Physiol.* 55 (7), 1233–1244. doi: 10.1093/pcp/pcu072
- Matamoros, M. A., Kim, A., Peñuelas, M., Ihling, C., Griesser, E., Hoffmann, R., et al. (2018). Protein carbonylation and glycation in legume nodules. *Plant Physiol.* 177, 1510-1528. doi: 10.1104/pp.18.00533
- Missihoun, T. D., and Kotchoni, S. O. (2017). Aldehyde dehydrogenases may modulate signaling by lipid peroxidation-derived bioactive aldehydes. *Plant Signaling Behav.* 12, e1387707. doi: 10.1080/15592324.2017.1387707
- Missihoun, T. D., Schmitz, J., Klug, R., Kirch, H. H., and Bartels, D. (2011). Betaine aldehyde dehydrogenase genes from *Arabidopsis* with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta* 233 (2), 369–382. doi: 10.1007/s00425-010-1297-4
- Morales, M., and Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiol.* 180, 1246-1250. doi: 10.1104/pp.19.00405
- Müller, S. M., Wang, S., Telman, W., Liebthal, M., Schnitzer, H., Viehhauser, A., et al. (2017). The redox-sensitive module of cyclophilin 20-3, 2-cysteine peroxiredoxin and cysteine synthase integrates sulfur metabolism and oxylipin signaling in the high light acclimation response. *Plant J.* 91, 995-1014. doi: 10.1111/tpj.13622
- Noctor, G., Lelarge-Trouverie, C., and Mhamdi, A. (2015). The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry* 112, 33-53. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.09.002
- Poole, L. B., Hall, A., and Nelson, K. J. (2011). Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. *Curr. Protoc. Toxicol.* 7, 9. doi: 10.1002/0471140856.tx0709s49

- Reichmann, D., Voth, W., and Jakob, U. (2018). Maintaining a healthy proteome during oxidative stress. *Mol. Cell.* 69, 203-213. doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.021
- Rodríguez-García, A., García-Vicente, R., Morales, M. L., Ortiz-Ruiz, A., Martínez-López, J., and Linares, M. (2020). Protein carbonylation and lipid peroxidation in hematological malignancies. *Antioxidants* 9, 1212. doi: 10.3390/antiox9121212
- Streitner, C., Köster, T., Simpson, C. G., Shaw, P., Danisman, S., Brown, J. W., et al. (2012). An hnRNP-like RNA-binding protein affects alternative splicing by in vivo interaction with transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 40 (22), 11240–11255. doi: 10.1093/nar/gks873
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., et al. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 49 (D1), D605–D612. doi: 10.1093/nar/gkaa1074
- Tola, A. J., Jaballi, A., and Missihoun, T. D. (2021). Protein carbonylation: Emerging roles in plant redox biology and future prospects. *Plants* 10, 1451. doi: 10.3390/plants10071451
- Wang, Y. Y., Hecker, A. G., and Hauser, B. A. (2014). The APX4 locus regulates seed vigor and seedling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 239, 909-919. doi: 10.1007/s00425-014-2025-2
- Waszczak, C., Akter, S., Eeckhout, D., Persiau, G., Wahni, K., Bodra, N., et al. (2014). Sulfenome mining in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 11545-11550. doi: 10.1073/pnas.1411607111
- Waszczak, C., Akter, S., Jacques, S., Huang, J., Messens, J., and van Breusegem, F. (2015). Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *J. Exp. Bot.* 66, 2923-2934. doi: 10.1093/jxb/erv084
- Weerapana, E., Wang, C., Simon, G. M., Richter, F., Khare, S., Dillon, M. B. D., et al. (2010). Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* 468, 790-795. doi: 10.1038/nature09472
- Wong, C. M., Cheema, A. K., Zhang, L., and Suzuki, Y. J. (2008). Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circ. Res.* 102, 310-318. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.159814
- Yoshida, K., Hara, A., Sugiura, K., Fukaya, Y., and Hisabori, T. (2018). Thioredoxin-like2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade supports oxidative thiol modulation in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E8296-E8304. doi: 10.1073/pnas.1808284115

Yu, L., Iqbal, S., Zhang, Y., Zhang, G., Ali, U., Lu, S., et al. (2021). Proteome-wide identification of s-sulphenylated cysteines in *Brassica napus*. *Plant Cell Environ.* 44, 3571-3582. doi: 10.1111/pce.14160

2.14. Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.1049681/full#supplementary-material>

2.14.1. Supplementary figures

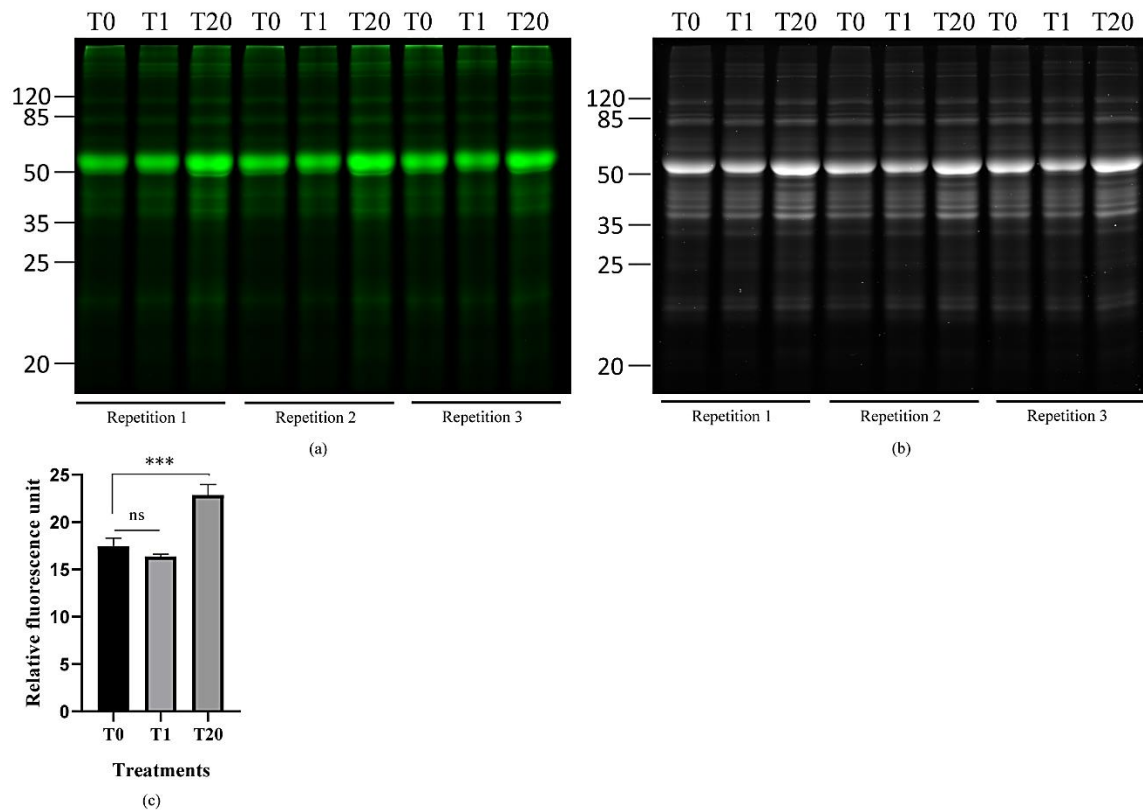


Figure S2. 1. Exogenous H₂O₂ modulates protein carbonylation in *A. thaliana* plant leaves. Proteins extracts were prepared and derivatized with cyanine hydrazide dyes before SDS-PAGE. A total of 10 µg of proteins was loaded each time per lane. Representative gel pictures for the carbonylated proteins (a) and total proteins (b), and relative fluorescence intensity of carbonylated proteins (c) for different experimental replication. One-way ANOVA analysis for fluorescence intensity (effect of exogenous-H₂O₂ on protein carbonylation) was significant for experiment ($p < 0.001$). For legend, T0: control, distilled water; T1: H₂O₂ at 1 mM; T20: H₂O₂ at 20 mM.

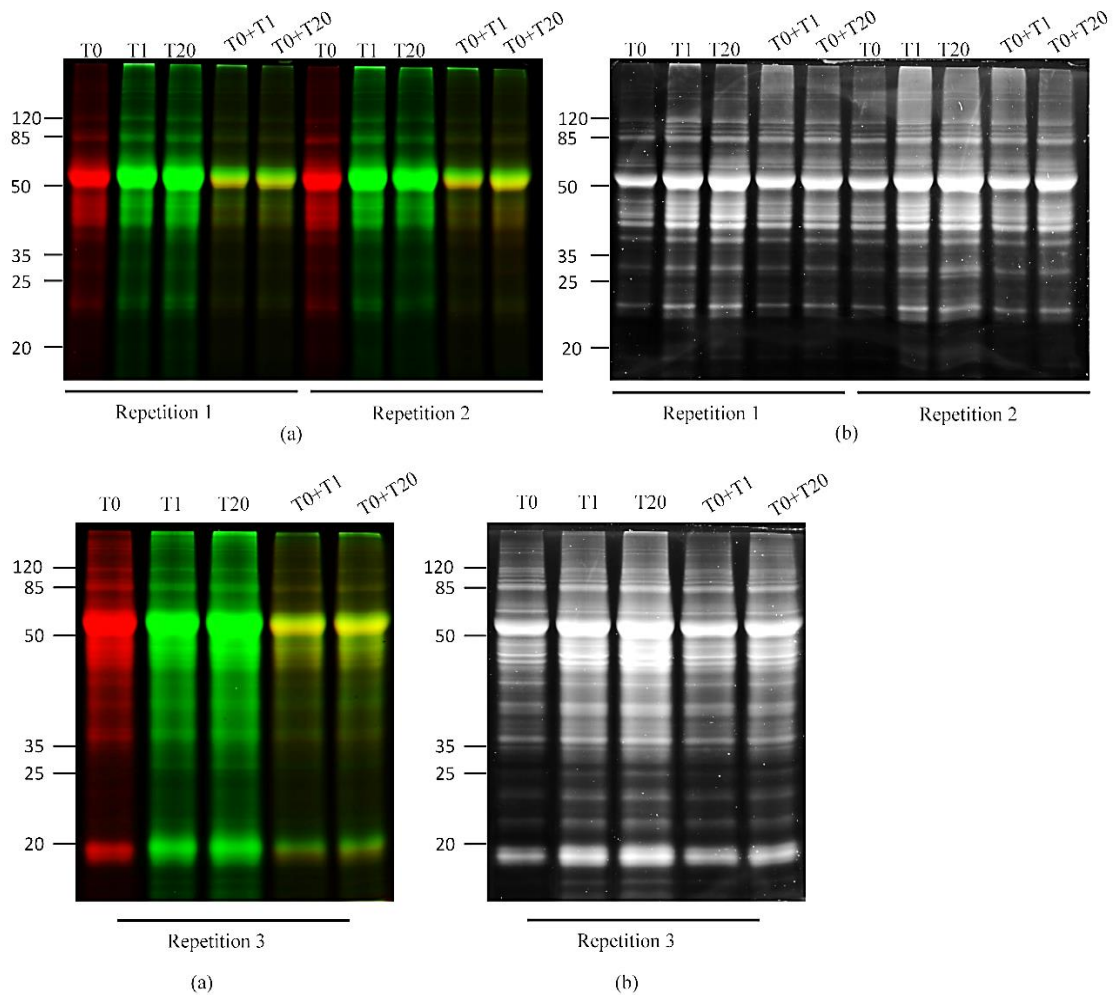


Figure S2. 2. Exogenous H₂O₂ modulates the level of protein carbonylation in *A. thaliana* plant leaves. Proteins in control samples were labeled with cyanine 5.5 hydrazide, while those in H₂O₂-treated samples were labeled with cyanine 7.5 hydrazide. Representative gel pictures for the carbonylated proteins (a) and total proteins (b) for different experimental replication. Line T0+T1, combine equal amount (5 μg) of the differently labeled control and 1 mM H₂O₂-treated samples; line T0+T20, combine equal amounts (5 μg) of differently labeled control and 20 mM H₂O₂-treated samples. For legend, T0: control, distilled water; T1: H₂O₂ at 1 mM; T20: H₂O₂ at 20 mM.

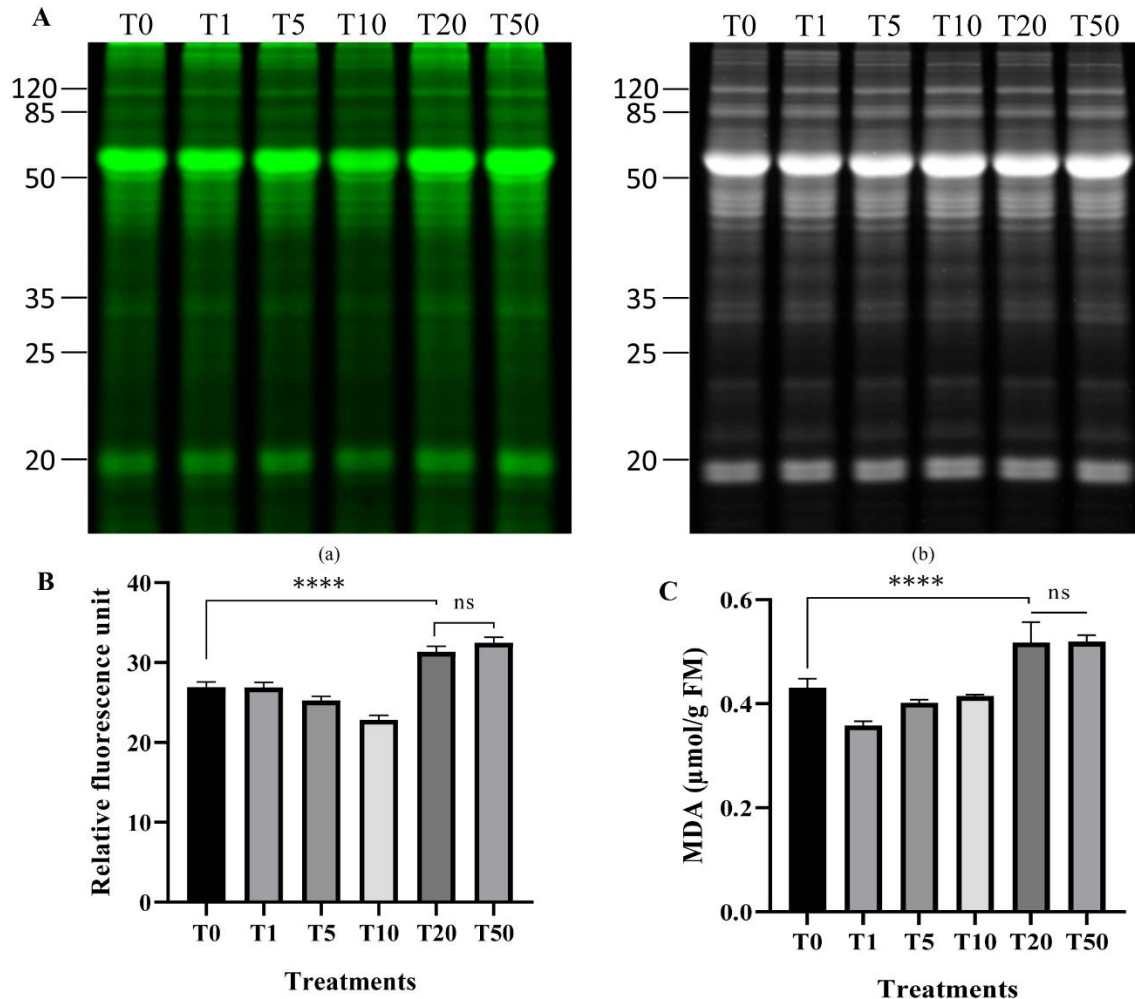


Figure S2. 3. Exogenous H_2O_2 modulates the level of protein carbonylation in *A. thaliana* leaves. Proteins in the different samples were labeled with the cyanine7.5 hydrazide probe before separation by SDS-PAGE. Each well of the gel was loaded with 10 μg of protein. (A) Gel image of carbonylated proteins (a) and gel image of total proteins stained with Azure red (b). (B) Relative abundance of carbonylated proteins as a function of probe intensity. (C) Malondialdehyde (MDA) content of leaves determined using the absorbance of the TBA-MDA (thiobarbituric acid-malondialdehyde) adduct measured at 532 nm. T0: untreated sample; T1: sample treated with 1 mM H_2O_2 ; T5: sample treated with 5 mM H_2O_2 ; T10: sample treated with 10 mM H_2O_2 ; T20: sample treated with 20 mM H_2O_2 ; T50: sample treated with 50 mM H_2O_2 . Results represent means \pm SD ($n = 3$) of three independent experiments. (ns: not significant; ****: $p < 0.0001$, one-way ANOVA and Tukey post hoc test).

2.14.2. Supplementary tables

Table S2. 1. Carbonylated proteins identified in the three replicates of the control samples (R1, R2 et R3) / P > 95% / minimum of 2 peptides / no decoys

Recovery 154 / 315							
#	Identified Proteins (315/733)	Accession Number	Alternate ID	MW	T0_R1	T0_R2	T0_R3
1	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=DXR PE=2 SV=2	Q9XFS9	DXR	52 kDa	5	4	2
2	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=BAS1 PE=1 SV=2	Q96291	BAS1	29 kDa	7	8	6
3	3-isopropylmalate dehydrogenase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=IMD1 PE=1 SV=1	B9DHH9 (+1)	IMD1	42 kDa	5	5	2
4	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MS1 PE=1 SV=1	O50008	MS1	84 kDa	21	25	16
5	14-3-3-like protein GF14 chi OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GRF1 PE=1 SV=3	P42643 (+1)	GRF1	30 kDa	7	6	2
6	20 kDa chaperonin, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPN20 PE=1 SV=2	O65282	CPN20	27 kDa	9	9	2

7	30S ribosomal protein S9, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPS9 PE=2 SV=1	Q9XJ27	RPS9	23 kDa	2	3	2
8	30S ribosomal protein S19, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=rps19 PE=3 SV=1	P56808	rps19	11 kDa	2	4	2
9	50S ribosomal protein L2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=rpl2- B PE=3 SV=1	P56791	rpl2-B	30 kDa	3	2	3
10	50S ribosomal protein L5, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL5 PE=2 SV=1	O04603	RPL5	28 kDa	2	2	2
11	60S ribosomal protein L3-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ARP1 PE=1 SV=5	P17094	ARP1	45 kDa	3	4	3
12	60S ribosomal protein L5-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL5B PE=2 SV=3	P49227 (+1)	RPL5B	34 kDa	6	6	2
13	60S ribosomal protein L6-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL6A PE=2 SV=1	Q9FZ76	RPL6A	26 kDa	3	4	3
14	60S ribosomal protein L8-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL8A PE=1 SV=2	P46286	RPL8A	28 kDa	4	4	3
15	60S ribosomal protein L9-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL9C PE=1 SV=3	P49209	RPL9C	22 kDa	3	6	2
16	60S ribosomal protein L13a-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL13AB PE=2 SV=1	Q9LRX8	RPL13AB	23 kDa	3	3	2
17	60S ribosomal protein L15-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL15A PE=2 SV=1	O23515 (+1)	RPL15A	24 kDa	5	3	4

18	ACT domain-containing protein ACR11 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ACR11 PE=1 SV=1	Q9FZ47	ACR11	31 kDa	3	4	3
19	Actin-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ACT2 PE=1 SV=1	Q96292 (+1)	ACT2	42 kDa	5	7	3
20	Actin-7 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ACT7 PE=1 SV=1	P53492	ACT7	42 kDa	4	5	4
21	Adenosine kinase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ADK1 PE=1 SV=1	Q9SF85	ADK1	38 kDa	8	7	6
22	Adenosylhomocysteinase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=SAHH1 PE=1 SV=1	O23255	SAHH1	53 kDa	9	8	4
23	Adenylosuccinate synthetase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PURA PE=1 SV=1	Q96529	PURA	53 kDa	3	5	3
24	ADP-ribosylation factor A1B OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ARFA1B PE=1 SV=1	A0A1P8BDK6 (+6)	ARFA1B	21 kDa	2	3	2
25	Aminomethyltransferase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g11860 PE=1 SV=1	A0A2H1ZEA9 (+1)	At1g11860	46 kDa	15	12	6
26	Aspartate aminotransferase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ASP5 PE=1 SV=1	B9DG21 (+2)	ASP5	51 kDa	3	4	4
27	AT4G23670 protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At4g23670 PE=1 SV=1	Q9SUR0	At4g23670	18 kDa	5	6	4
28	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=atpA PE=1 SV=1	P56757	atpA	55 kDa	17	17	7

29	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=atpB PE=1 SV=2	P19366	atpB	54 kDa	37	45	24
30	ATP synthase subunit beta-1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At5g08670 PE=1 SV=1	P83483 (+2)	At5g08670	60 kDa	13	14	12
31	ATP synthase subunit delta, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ATPD PE=1 SV=1	Q9SSS9	ATPD	26 kDa	3	5	2
32	ATP-citrate synthase beta chain protein 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ACLB-2 PE=1 SV=1	Q9FGX1	ACLB-2	66 kDa	2	3	2
33	Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=BCA1 PE=1 SV=2	P27140	BCA1	37 kDa	33	34	18
34	Beta carbonic anhydrase 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=BCA2 PE=1 SV=3	P42737	BCA2	37 kDa	29	31	14
35	Bifunctional enolase 2/transcriptional activator OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ENO2 PE=1 SV=1	P25696	ENO2	48 kDa	15	12	6
36	Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase C1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CYSC1 PE=1 SV=1	Q9S757	CYSC1	40 kDa	2	2	2

37	Calvin cycle protein CP12-1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CP12-1 PE=1 SV=1	O22914	CP12-1	13 kDa	5	3	4
38	Catalase-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CAT2 PE=1 SV=3	P25819	CAT2	57 kDa	14	14	9
39	Catalase-3 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CAT3 PE=1 SV=3	Q42547	CAT3	57 kDa	8	14	6
40	Chaperonin 60 subunit alpha 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPN60A1 PE=1 SV=2	P21238	CPN60A1	62 kDa	11	11	7
41	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPN60B1 PE=1 SV=3	P21240	CPN60B1	64 kDa	14	13	10
42	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa a, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CSP41A PE=1 SV=1	Q9LYA9	CSP41A	44 kDa	5	4	4
43	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa b, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CSP41B PE=1 SV=1	Q9SA52 (+1)	CSP41B	43 kDa	8	12	9
44	Cold, circadian rhythm, and rna binding 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GRP7 PE=1 SV=1	F4IHK9 (+1)	GRP7	16 kDa	5	5	2
45	Cysteine synthase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=OASA1 PE=1 SV=2	P47998	OASA1	34 kDa	4	7	3

46	Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=OASB PE=1 SV=2	P47999	OASB	42 kDa	3	4	5
47	Cystine lyase CORI3 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CORI3 PE=1 SV=1	Q9SUR6	CORI3	47 kDa	13	15	5
48	Dihydrolipoyl dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=LPD1 PE=1 SV=2	Q9M5K3	LPD1	54 kDa	5	5	2
49	Early nodulin-like protein 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At4g27520 PE=1 SV=1	Q9T076	At4g27520	35 kDa	2	3	2
50	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=A1 PE=1 SV=1	P0DH99 (+3)	A1	50 kDa	8	6	6
51	Elongation factor 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=LOS1 PE=1 SV=1	Q9ASR1	LOS1	94 kDa	8	8	4
52	Elongation factor G, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPEFG PE=1 SV=1	Q9SI75	CPEFG	86 kDa	10	11	3
53	Elongation factor Tu, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TUFA PE=1 SV=1	P17745	TUFA	52 kDa	10	13	7
54	Eukaryotic translation initiation factor 4A1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=EIF4A1 PE=1 SV=1	A0A119LSZ7 (+3)	EIF4A1	47 kDa	5	5	3

55	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=LFNR1 PE=1 SV=1	Q9FKW6	LFNR1	40 kDa	7	4	5
56	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=LFNR2 PE=1 SV=1	Q8W493	LFNR2	41 kDa	5	6	5
57	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1, chloroplastic/mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GLU1 PE=1 SV=3	Q9ZNZ7	GLU1	177 kDa	28	33	18
58	Fructose-1,6-bisphosphatase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CFBP1 PE=1 SV=2	P25851	CFBP1	45 kDa	5	8	4
59	Fructose-bisphosphate aldolase 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=FBA2 PE=1 SV=2	Q944G9	FBA2	43 kDa	19	23	16
60	Fructose-bisphosphate aldolase 5, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=FBA5 PE=1 SV=1	O65581	FBA5	38 kDa	5	9	3
61	Fructose-bisphosphate aldolase 8, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=FBA8 PE=1 SV=1	Q9LF98	FBA8	39 kDa	6	10	4
62	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=FBA1 PE=1 SV=1	F4IGL5 (+1)	FBA1	42 kDa	17	16	14
63	G-box regulating factor 6 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GRF6 PE=1 SV=1	F4KGV2 (+2)	GRF6	28 kDa	4	3	2

64	Gamma-glutamyl peptidase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GGP1 PE=1 SV=1	Q9M0A7	GGP1	28 kDa	2	2	2
65	GDP-mannose 3,5-epimerase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At5g28840 PE=1 SV=1	Q93VR3	At5g28840	43 kDa	2	2	2
66	GDSL esterase/lipase ESM1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ESM1 PE=1 SV=1	Q9LJG3	ESM1	44 kDa	8	8	6
67	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g29670 PE=1 SV=1	A0A1P8ASL8 (+1)	At1g29670	48 kDa	2	2	2
68	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ADG2 PE=1 SV=3	P55229	ADG2	58 kDa	3	3	2
69	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=APS1 PE=2 SV=2	P55228	APS1	57 kDa	4	4	5
70	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GSA2 PE=1 SV=2	Q42522	GSA2	50 kDa	7	6	4
71	Glutamate--glyoxylate aminotransferase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GGAT1 PE=1 SV=1	Q9LR30	GGAT1	53 kDa	13	21	8
72	Glutamine synthetase, chloroplastic/mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GLN2 PE=1 SV=1	Q43127	GLN2	47 kDa	13	16	13

73	Glutathione S-transferase DHAR1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=DHAR1 PE=1 SV=1	Q9FWR4	DHAR1	24 kDa	5	6	4
74	Glutathione S-transferase F2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GSTF2 PE=1 SV=3	P46422	GSTF2	24 kDa	2	2	3
75	Glutathione S-transferase U5 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GSTU5 PE=2 SV=1	P46421	GSTU5	26 kDa	2	2	2
76	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPA1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GAPA1 PE=1 SV=3	P25856	GAPA1	42 kDa	15	15	9
77	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPB, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GAPB PE=1 SV=2	P25857	GAPB	48 kDa	15	17	10
78	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GAPC2 PE=1 SV=1	Q9FX54	GAPC2	37 kDa	11	12	11
79	Glycerate dehydrogenase HPR, peroxisomal OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HPR PE=1 SV=1	Q9C9W5	HPR	42 kDa	6	9	4
80	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GLDP1 PE=1 SV=2	Q94B78	GLDP1	113 kDa	18	19	9
81	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 2, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GLDP2 PE=1 SV=1	O80988	GLDP2	114 kDa	12	12	5

82	Glycolate oxidase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GLO1 PE=1 SV=1	Q9LRR9	GLO1	40 kDa	14	17	8
83	Glycolate oxidase 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GLO2 PE=1 SV=1	Q9LRS0	GLO2	40 kDa	11	16	8
84	HARMLESS TO OZONE LAYER 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HOL1 PE=1 SV=1	A0A2H1ZE37 (+1)	HOL1	24 kDa	2	2	2
85	Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HSP70-1 PE=1 SV=3	P22953	HSP70-1	71 kDa	10	15	5
86	Heat shock 70 kDa protein 6, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HSP70-6 PE=1 SV=1	Q9STW6	HSP70-6	77 kDa	9	10	4
87	Heat shock 70 kDa protein 7, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HSP70-7 PE=2 SV=1	Q9LTX9	HSP70-7	77 kDa	7	8	5
88	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=BIP2 PE=1 SV=1	A0A1P8BF32 (+2)	BIP2	74 kDa	5	4	2
89	Heat shock protein 90-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HSP90-2 PE=1 SV=1	P55737	HSP90-2	80 kDa	3	4	2
90	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At3g58610 PE=1 SV=2	Q05758	At3g58610	64 kDa	5	6	3
91	L-ascorbate peroxidase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=APX1 PE=1 SV=1	F4HU93 (+1)	APX1	28 kDa	7	8	4

92	Lipoxygenase 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=LOX2 PE=1 SV=1	P38418	LOX2	102 kDa	18	16	9
93	LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=DAP PE=1 SV=1	Q93ZN9	DAP	50 kDa	5	3	3
94	Magnesium-chelatase subunit ChII-1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CHLI1 PE=1 SV=1	P16127	CHLI1	46 kDa	3	4	2
95	Malate dehydrogenase 1, cytoplasmic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MDH1 PE=1 SV=2	P93819	MDH1	36 kDa	8	6	5
96	Malate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g53240 PE=1 SV=1	Q9ZP06	At1g53240	36 kDa	9	7	4
97	Malate dehydrogenase 2, peroxisomal OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PMDH2 PE=1 SV=1	Q9ZP05 (+1)	PMDH2	37 kDa	5	12	4
98	Malate dehydrogenase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At3g47520 PE=1 SV=1	Q9SN86	At3g47520	42 kDa	3	5	3
99	Methylenetetrahydrofolate reductase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MTHFR1 PE=1 SV=1	Q9SE60	MTHFR1	66 kDa	3	6	2
100	MLP-like protein 423 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MLP423 PE=2 SV=1	Q93VR4	MLP423	17 kDa	2	3	3

101	Monodehydroascorbate reductase 1, peroxisomal OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MDAR1 PE=1 SV=1	Q9LFA3	MDAR1	46 kDa	6	7	4
102	Monodehydroascorbate reductase 6 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MDAR6 PE=1 SV=1	F4I576 (+1)	MDAR6	52 kDa	5	5	3
103	Myrosinase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TGG1 PE=1 SV=1	P37702	TGG1	61 kDa	10	15	7
104	Myrosinase 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TGG2 PE=1 SV=1	Q9C5C2	TGG2	63 kDa	14	21	10
105	NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=AOR PE=1 SV=2	Q9ZUC1	AOR	41 kDa	3	6	2
106	Nitrilase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=NIT1 PE=1 SV=2	P32961	NIT1	38 kDa	6	6	4
107	Nodulin-related protein 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g13930 PE=1 SV=1	Q9XI93	At1g13930	16 kDa	5	5	5
108	Nuclear protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g16080 PE=1 SV=1	Q9S9M7	At1g16080	34 kDa	3	3	2
109	Oxygen-evolving enhancer protein 1-2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PSBO2 PE=1 SV=1	Q9S841	PSBO2	35 kDa	3	4	2
110	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PSBP1 PE=1 SV=2	Q42029	PSBP1	28 kDa	6	8	6

111	Oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PSBQ1 PE=1 SV=3	Q9XF73	PSBQ1	24 kDa	7	7	3
112	Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PSBQ2 PE=1 SV=2	Q41932	PSBQ2	25 kDa	6	6	2
113	Peptidase M1 family protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g63770 PE=1 SV=1	B3H621 (+3)	At1g63770	106 kDa	2	4	3
114	Peptide methionine sulfoxide reductase A4, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MSR4 PE=1 SV=2	P54150	MSR4	29 kDa	3	3	2
115	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP18-3 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CYP18-3 PE=1 SV=1	P34790	CYP18-3	18 kDa	4	5	2
116	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CYP19-1 PE=1 SV=1	Q38900	CYP19-1	18 kDa	3	3	2
117	Peroxiredoxin-2E, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PRXIII PE=1 SV=2	Q949U7	PRXIII	25 kDa	5	6	4
118	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PPC2 PE=1 SV=2	Q5GM68	PPC2	110 kDa	6	7	4

119	Phosphoglucomutase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PGMP PE=1 SV=2	Q9SCY0	PGMP	68 kDa	4	6	2
120	Phosphoglycerate kinase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PGK1 PE=1 SV=1	Q9LD57	PGK1	50 kDa	27	32	19
121	Phosphoglycerate kinase 3, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PGK3 PE=1 SV=1	Q9SAJ4	PGK3	42 kDa	8	6	3
122	Phosphoglycerate kinase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g56190 PE=1 SV=1	F4I3L1 (+1)	At1g56190	43 kDa	18	23	14
123	Phosphoglycolate phosphatase 1A, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PGLP1A PE=1 SV=1	P0DKC3 (+1)	PGLP1A	40 kDa	7	13	7
124	Phosphoribulokinase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g32060 PE=1 SV=1	P25697	At1g32060	44 kDa	21	19	12
125	Photosystem II CP43 reaction center protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=psbC PE=1 SV=3	P56778	psbC	52 kDa	4	6	4
126	Photosystem II CP47 reaction center protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=psbB PE=1 SV=1	P56777	psbB	56 kDa	4	2	2

127	Photosystem II stability/assembly factor, chloroplast (HCF136) OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HCF136 PE=1 SV=1	A0A1P8BG37 (+1)	HCF136	47 kDa	4	4	2
128	Presequence protease 1, chloroplastic/mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PREP1 PE=1 SV=2	Q9LJL3	PREP1	121 kDa	6	5	3
129	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 9 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CAD9 PE=1 SV=2	P42734	CAD9	39 kDa	3	3	2
130	Probable ribose-5-phosphate isomerase 3, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPI3 PE=1 SV=1	Q9S726	RPI3	29 kDa	7	7	5
131	Receptor for activated C kinase 1A OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RACK1A PE=1 SV=2	O24456	RACK1A	36 kDa	5	5	2
132	Ribosome-recycling factor, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RRF PE=2 SV=2	Q9M1X0	RRF	30 kDa	5	3	4
133	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=rbcL PE=1 SV=1	O03042	rbcL	53 kDa	126	138	87
134	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit 1A, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RBCS-1A PE=1 SV=2	P10795	RBCS-1A	20 kDa	20	25	16

135	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit 3B, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RBCS-3B PE=1 SV=2	P10798 (+1)	RBCS-3B	20 kDa	20	26	12
136	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RCA PE=1 SV=2	P10896	RCA	52 kDa	26	34	15
137	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPE PE=2 SV=1	Q9SAU2	RPE	30 kDa	2	5	2
138	RNA-binding protein CP33, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CP33 PE=2 SV=1	Q39061	CP33	36 kDa	2	2	2
139	Rotamase CYP 4 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ROC4 PE=1 SV=1	F4IX26 (+2)	ROC4	34 kDa	12	11	10
140	S-adenosylmethionine synthase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=SAM1 PE=1 SV=2	P23686	SAM1	43 kDa	6	7	6
141	S-adenosylmethionine synthase 4 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=METK4 PE=1 SV=1	Q9LUT2	METK4	43 kDa	5	6	5
142	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At3g55800 PE=2 SV=1	P46283	At3g55800	42 kDa	11	14	9
143	Serine--glyoxylate aminotransferase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=AGT1 PE=1 SV=2	Q56YA5	AGT1	44 kDa	14	21	11

144	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MNC6.3 PE=1 SV=1	F4JX83 (+2)	MNC6	27 kDa	3	4	2
145	Thioredoxin H3 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TRX3 PE=1 SV=1	Q42403	TRX3	13 kDa	2	3	2
146	Thioredoxin M1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g03680 PE=1 SV=1	O48737	At1g03680	20 kDa	8	7	5
147	Thioredoxin-dependent peroxiredoxin OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PRXQ PE=1 SV=1	A0A119LR27 (+2)	PRXQ	17 kDa	6	10	4
148	Transketolase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=AtTKL1 PE=1 SV=1	F4JBY2 (+1)	AtTKL1	80 kDa	25	37	23
149	Translation elongation factor EF1B/ribosomal protein S6 family protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=eEF-1Bb1 PE=1 SV=1	A8MRC4 (+2)	eEF-1Bb1	29 kDa	2	3	2
150	Triosephosphate isomerase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TIM PE=1 SV=1	Q9SKP6	TIM	33 kDa	6	5	4
151	Triosephosphate isomerase, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CTIMC PE=1 SV=2	P48491	CTIMC	27 kDa	7	8	3
152	Tubulin alpha-2 chain OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TUBA2 PE=2 SV=2	B9DGT7 (+2)	TUBA2	50 kDa	2	5	2

153	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=UGP1 PE=1 SV=1	A0A1I9LT02 (+2)	UGP1	53 kDa	5	3	3
154	V-type proton ATPase subunit B1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=VHA-B1 PE=2 SV=2	P11574 (+1)	VHA-B1	54 kDa	4	4	3

Table S2. 2. Carbonylated proteins identified in the three replicates of H₂O₂-treated samples (R1, R2, R3) / P > 95% / Minimum of 2 peptides / No Decoys

Recovery 150 / 295							
#	Identified Proteins (295/733)	Accession Number	Alternate ID	MW	T20_R 1	T20_R 2	T20_R 3
1	Tubulin alpha-2 chain OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TUBA2 PE=2 SV=2	B9DGT7 (+2)	TUBA2	50 kDa	4	2	5
2	Triosephosphate isomerase, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CTIMC PE=1 SV=2	P48491	CTIMC	27 kDa	6	2	7
3	Transketolase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=AtTKL1 PE=1 SV=1	F4JBY2 (+1)	AtTKL1	80 kDa	30	16	26
4	Thioredoxin-dependent peroxiredoxin OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PRXQ PE=1 SV=1	A0A1I9LR27 (+2)	PRXQ	17 kDa	8	7	13
5	Thioredoxin M2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TRXM2 PE=1 SV=2	Q9SEU8	TRXM2	20 kDa	2	3	2
6	Thioredoxin M1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g03680 PE=1 SV=1	O48737	At1g03680	20 kDa	6	4	4
7	Starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=SS1 PE=2 SV=1	Q9FNF2	SS1	72 kDa	3	2	4
8	Serine--glyoxylate aminotransferase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=AGT1 PE=1 SV=2	Q56YA5	AGT1	44 kDa	19	10	3

9	Serine hydroxymethyltransferase 1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=SHM1 PE=1 SV=1	Q9SZJ5	SHM1	57 kDa	7	2	11
10	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At3g55800 PE=2 SV=1	P46283	At3g5580 0	42 kDa	10	7	21
11	S-adenosylmethionine synthase 4 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=METK4 PE=1 SV=1	Q9LUT2	METK4	43 kDa	6	5	12
12	S-adenosylmethionine synthase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=SAM1 PE=1 SV=2	P23686	SAM1	43 kDa	6	6	11
13	Rotamase CYP 4 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ROC4 PE=1 SV=1	F4IX26 (+2)	ROC4	34 kDa	12	9	28
14	RNA-binding protein CP29B, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CP29B PE=1 SV=1	Q9ZUU4	CP29B	31 kDa	2	2	4
15	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RCA PE=1 SV=2	P10896	RCA	52 kDa	36	27	89
16	Ribulose bisphosphate carboxylase small subunit 3B, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RBCS-3B PE=1 SV=2	P10798 (+1)	RBCS-3B	20 kDa	20	20	93
17	Ribulose bisphosphate carboxylase small subunit 1B, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RBCS-1B PE=1 SV=1	P10796	RBCS-1B	20 kDa	19	19	92

18	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit 1A, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RBCS-1A PE=1 SV=2	P10795	RBCS-1A	20 kDa	22	21	85
19	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=rbcL PE=1 SV=1	O03042	rbcL	53 kDa	150	107	255
20	Ribosome-recycling factor, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RRF PE=2 SV=2	Q9M1X0	RRF	30 kDa	3	2	4
21	Ribosomal protein S6e OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=EMB3010 PE=1 SV=1	F4KGU2 (+2)	EMB3010	22 kDa	4	2	3
22	Profilin-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PRF2 PE=1 SV=1	Q42418	PRF2	14 kDa	2	2	4
23	Probable ribose-5-phosphate isomerase 3, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPI3 PE=1 SV=1	Q9S726	RPI3	29 kDa	8	5	4
24	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 9 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CAD9 PE=1 SV=2	P42734	CAD9	39 kDa	2	2	6
25	Presequence protease 1, chloroplastic/mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PREP1 PE=1 SV=2	Q9LJL3	PREP1	121 kDa	4	2	10
26	Porphobilinogen deaminase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HEMC PE=1 SV=1	Q43316	HEMC	41 kDa	2	2	8

27	Photosystem II stability/assembly factor, chloroplast (HCF136) OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HCF136 PE=1 SV=1	A0A1P8BG37 (+1)	HCF136	47 kDa	5	2	8
28	Phosphoribulokinase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g32060 PE=1 SV=1	P25697	At1g32060	44 kDa	10	9	16
29	Phosphoglycolate phosphatase 1A, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PGLP1A PE=1 SV=1	P0DKC3 (+1)	PGLP1A	40 kDa	10	7	12
30	Phosphoglycerate kinase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g56190 PE=1 SV=1	F4I3L1 (+1)	At1g56190	43 kDa	16	14	20
31	Phosphoglycerate kinase 3, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PGK3 PE=1 SV=1	Q9SAJ4	PGK3	42 kDa	6	4	7
32	Phosphoglycerate kinase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PGK1 PE=1 SV=1	Q9LD57	PGK1	50 kDa	23	21	24
33	Peroxiredoxin-2E, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PRXIIIE PE=1 SV=2	Q949U7	PRXIIIE	25 kDa	5	4	7
34	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CYP38 PE=1 SV=1	Q9SSA5	CYP38	48 kDa	3	3	4
35	Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PSBQ2 PE=1 SV=2	Q41932	PSBQ2	25 kDa	5	3	13

36	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PSBP1 PE=1 SV=2	Q42029	PSBP1	28 kDa	7	5	24
37	Oxygen-evolving enhancer protein 1-2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PSBO2 PE=1 SV=1	Q9S841	PSBO2	35 kDa	2	2	9
38	Nucleoside diphosphate kinase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=NDK1 PE=1 SV=1	P39207	NDK1	17 kDa	5	3	11
39	Nuclear protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g16080 PE=1 SV=1	Q9S9M7	At1g1608 0	34 kDa	2	2	6
40	Nodulin-related protein 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g13930 PE=1 SV=1	Q9XI93	At1g1393 0	16 kDa	5	4	7
41	Nitrilase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=NIT1 PE=1 SV=2	P32961	NIT1	38 kDa	5	2	7
42	Nitrate reductase [NADH] 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=NIA2 PE=1 SV=1	P11035	NIA2	103 kDa	4	2	9
43	NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=POR C PE=1 SV=1	F4I2F8 (+1)	POR	44 kDa	3	3	6
44	NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=AOR PE=1 SV=2	Q9ZUC1	AOR	41 kDa	2	2	4
45	NADP-dependent malic enzyme 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=NADP- ME2 PE=1 SV=1	Q9LYG3	NADP- ME2	64 kDa	4	3	2

46	Myrosinase 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TGG2 PE=1 SV=1	Q9C5C2	TGG2	63 kDa	11	4	4
47	Myrosinase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TGG1 PE=1 SV=1	P37702	TGG1	61 kDa	9	8	15
48	Monodehydroascorbate reductase 6 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MDAR6 PE=1 SV=1	F4I576 (+1)	MDAR6	52 kDa	4	2	8
49	Monodehydroascorbate reductase 1, peroxisomal OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MDAR1 PE=1 SV=1	Q9LFA3	MDAR1	46 kDa	6	3	9
50	Malate dehydrogenase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At3g47520 PE=1 SV=1	Q9SN86	At3g4752 0	42 kDa	3	2	4
51	Malate dehydrogenase 2, peroxisomal OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PMDH2 PE=1 SV=1	Q9ZP05 (+1)	PMDH2	37 kDa	8	8	8
52	Malate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g53240 PE=1 SV=1	Q9ZP06	At1g5324 0	36 kDa	6	5	10
53	Malate dehydrogenase 1, cytoplasmic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MDH1 PE=1 SV=2	P93819	MDH1	36 kDa	8	4	4
54	LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=DAP PE=1 SV=1	Q93ZN9	DAP	50 kDa	4	2	8

55	Lipoxygenase 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=LOX2 PE=1 SV=1	P38418	LOX2	102 kDa	8	5	18
56	L-ascorbate peroxidase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=APX1 PE=1 SV=1	F4HU93 (+1)	APX1	28 kDa	6	4	18
57	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At3g58610 PE=1 SV=2	Q05758	At3g58610	64 kDa	3	2	8
58	Heat shock 70 kDa protein 6, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HSP70-6 PE=1 SV=1	Q9STW6	HSP70-6	77 kDa	8	2	12
59	Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HSP70-1 PE=1 SV=3	P22953	HSP70-1	71 kDa	9	7	25
60	HARMLESS TO OZONE LAYER 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HOL1 PE=1 SV=1	A0A2H1ZE37 (+1)	HOL1	24 kDa	2	2	2
61	Glycolate oxidase 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GLO2 PE=1 SV=1	Q9LRS0	GLO2	40 kDa	12	10	19
62	Glycolate oxidase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GLO1 PE=1 SV=1	Q9LRR9	GLO1	40 kDa	14	9	16
63	Glycine-rich RNA-binding protein 8 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RBG8 PE=1 SV=1	Q03251	RBG8	17 kDa	6	2	9
64	Glycine--tRNA ligase, mitochondrial 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g29880 PE=1 SV=1	O23627	At1g29880	82 kDa	4	2	4

65	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GLDP1 PE=1 SV=2	Q94B78	GLDP1	113 kDa	16	7	18
66	Glycine cleavage system H protein 3, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GDH3 PE=1 SV=1	Q9LQL0	GDH3	18 kDa	3	2	6
67	Glycerate dehydrogenase HPR, peroxisomal OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=HPR PE=1 SV=1	Q9C9W5	HPR	42 kDa	6	2	12
68	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GAPC2 PE=1 SV=1	Q9FX54	GAPC2	37 kDa	14	12	24
69	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPB, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GAPB PE=1 SV=2	P25857	GAPB	48 kDa	18	12	29
70	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPA1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GAPA1 PE=1 SV=3	P25856	GAPA1	42 kDa	17	9	15
71	Glutathione S-transferase F2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GSTF2 PE=1 SV=3	P46422	GSTF2	24 kDa	2	2	4
72	Glutamine synthetase, chloroplastic/mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GLN2 PE=1 SV=1	Q43127	GLN2	47 kDa	18	12	14
73	Glutamate--glyoxylate aminotransferase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GGAT1 PE=1 SV=1	Q9LR30	GGAT1	53 kDa	13	10	20

74	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GSA2 PE=1 SV=2	Q42522	GSA2	50 kDa	4	5	16
75	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=APS1 PE=2 SV=2	P55228	APS1	57 kDa	3	2	4
76	General regulatory factor 8 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GRF8 PE=1 SV=1	F4KHY7 (+1)	GRF8	30 kDa	2	2	6
77	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g29670 PE=1 SV=1	A0A1P8ASL8 (+1)	At1g29670	48 kDa	4	2	5
78	GDSL esterase/lipase ESM1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ESM1 PE=1 SV=1	Q9LJG3	ESM1	44 kDa	9	7	7
79	GDP-mannose 3,5-epimerase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At5g28840 PE=1 SV=1	Q93VR3	At5g28840	43 kDa	2	2	5
80	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=FBA1 PE=1 SV=1	F4IGL5 (+1)	FBA1	42 kDa	14	11	14
81	Fructose-bisphosphate aldolase 8, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=FBA8 PE=1 SV=1	Q9LF98	FBA8	39 kDa	7	3	12
82	Fructose-bisphosphate aldolase 5, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=FBA5 PE=1 SV=1	O65581	FBA5	38 kDa	5	2	5
83	Fructose-bisphosphate aldolase 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=FBA2 PE=1 SV=2	Q944G9	FBA2	43 kDa	15	13	12

84	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CYFBP PE=1 SV=1	Q9MA79	CYFBP	37 kDa	5	2	14
85	Fructose-1,6-bisphosphatase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CFBP1 PE=1 SV=2	P25851	CFBP1	45 kDa	8	2	14
86	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1, chloroplastic/mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GLU1 PE=1 SV=3	Q9ZNZ7	GLU1	177 kDa	33	13	34
87	Ferredoxin--nitrite reductase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=NIR1 PE=1 SV=1	Q39161	NIR1	66 kDa	3	3	5
88	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=LFNR2 PE=1 SV=1	Q8W493	LFNR2	41 kDa	6	6	11
89	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=LFNR1 PE=1 SV=1	Q9FKW6	LFNR1	40 kDa	4	6	11
90	Elongation factor Tu, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TUFA PE=1 SV=1	P17745	TUFA	52 kDa	14	5	19
91	Elongation factor G, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPEFG PE=1 SV=1	Q9SI75	CPEFG	86 kDa	7	3	8
92	Elongation factor 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=LOS1 PE=1 SV=1	Q9ASR1	LOS1	94 kDa	7	3	11

93	Elongation factor 1-beta 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At5g19510 PE=1 SV=1	Q9SCX3	At5g19510	24 kDa	2	2	3
94	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=A1 PE=1 SV=1	P0DH99 (+3)	A1	50 kDa	7	4	18
95	Early nodulin-like protein 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At4g27520 PE=1 SV=1	Q9T076	At4g27520	35 kDa	2	3	3
96	Dihydrolipoyl dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=LPD1 PE=1 SV=2	Q9M5K3	LPD1	54 kDa	4	2	5
97	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=petC PE=1 SV=1	Q9ZR03	petC	24 kDa	2	2	4
98	Cystine lyase CORI3 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CORI3 PE=1 SV=1	Q9SUR6	CORI3	47 kDa	8	4	3
99	Cysteine synthase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=OASA1 PE=1 SV=2	P47998	OASA1	34 kDa	5	2	10
100	Cold, circadian rhythm, and rna binding 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GRP7 PE=1 SV=1	F4IHK9 (+1)	GRP7	16 kDa	6	3	7
101	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa b, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CSP41B PE=1 SV=1	Q9SA52 (+1)	CSP41B	43 kDa	13	11	13
102	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa a, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CSP41A PE=1 SV=1	Q9LYA9	CSP41A	44 kDa	7	2	11

103	Chaperonin 60 subunit beta 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPN60B1 PE=1 SV=3	P21240	CPN60B1	64 kDa	18	7	18
104	Chaperonin 60 subunit alpha 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPN60A1 PE=1 SV=2	P21238	CPN60A1	62 kDa	12	5	17
105	Catalase-3 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CAT3 PE=1 SV=3	Q42547	CAT3	57 kDa	6	6	11
106	Catalase-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CAT2 PE=1 SV=3	P25819	CAT2	57 kDa	11	6	7
107	Bifunctional enolase 2/transcriptional activator OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ENO2 PE=1 SV=1	P25696	ENO2	48 kDa	12	10	17
108	Beta carbonic anhydrase 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=BCA2 PE=1 SV=3	P42737	BCA2	37 kDa	32	22	29
109	Beta carbonic anhydrase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=BCA1 PE=1 SV=2	P27140	BCA1	37 kDa	34	24	33
110	ATP-citrate synthase beta chain protein 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ACLB-2 PE=1 SV=1	Q9FGX1	ACLB-2	66 kDa	2	2	5
111	ATP synthase subunit delta, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ATPD PE=1 SV=1	Q9SSS9	ATPD	26 kDa	4	2	4

112	ATP synthase subunit beta-1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At5g08670 PE=1 SV=1	P83483 (+2)	At5g0867 0	60 kDa	11	9	18
113	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=atpB PE=1 SV=2	P19366	atpB	54 kDa	31	28	56
114	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=atpA PE=1 SV=1	P56757	atpA	55 kDa	16	8	15
115	ATP sulfurylase 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=APS2 PE=1 SV=1	Q43870	APS2	54 kDa	3	2	4
116	ATP sulfurylase 1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=APS1 PE=1 SV=1	Q9LIK9	APS1	51 kDa	3	2	3
117	AT4G23670 protein OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At4g23670 PE=1 SV=1	Q9SUR0	At4g2367 0	18 kDa	2	4	4
118	Aspartate aminotransferase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ASP5 PE=1 SV=1	B9DG21 (+2)	ASP5	51 kDa	3	2	11
119	Ascorbate peroxidase 4 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TL29 PE=1 SV=1	A0A1P8B8W6 (+2)	TL29	31 kDa	2	2	7
120	Aminomethyltransferase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At1g11860 PE=1 SV=1	A0A2H1ZEA9 (+1)	At1g11860	46 kDa	15	6	17
121	Amidophosphoribosyltransferase 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ASE2 PE=1 SV=1	Q9STG9	ASE2	61 kDa	2	2	5

122	Alpha-glucan phosphorylase 2, cytosolic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PHS2 PE=1 SV=1	Q9SD76	PHS2	95 kDa	2	3	7
123	Alcohol dehydrogenase class-3 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ADH2 PE=1 SV=2	Q96533	ADH2	41 kDa	4	4	8
124	ADP-ribosylation factor A1B OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ARFA1B PE=1 SV=1	A0A1P8BDK6 (+6)	ARFA1B	21 kDa	2	2	3
125	Adenylosuccinate synthetase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=PURA PE=1 SV=1	Q96529	PURA	53 kDa	2	2	2
126	Adenosylhomocysteinase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=SAHH1 PE=1 SV=1	O23255	SAHH1	53 kDa	8	3	17
127	Adenosine kinase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ADK1 PE=1 SV=1	Q9SF85	ADK1	38 kDa	7	3	6
128	Actin-7 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ACT7 PE=1 SV=1	P53492	ACT7	42 kDa	7	5	12
129	Actin-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ACT2 PE=1 SV=1	Q96292 (+1)	ACT2	42 kDa	7	4	13
130	Aconitate hydratase 3, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ACO3 PE=1 SV=2	Q9SIB9	ACO3	108 kDa	5	4	5
131	Acetylornithine aminotransferase, chloroplastic/mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=WIN1 PE=1 SV=1	Q9M8M7	WIN1	49 kDa	2	3	6
132	60S ribosomal protein L18-3 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL18C PE=2 SV=1	Q940B0	RPL18C	21 kDa	3	2	3

133	60S ribosomal protein L15-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL15A PE=2 SV=1	O23515 (+1)	RPL15A	24 kDa	3	3	8
134	60S ribosomal protein L13a-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL13AB PE=2 SV=1	Q9LRX8	RPL13AB	23 kDa	2	2	3
135	60S ribosomal protein L9-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL9C PE=1 SV=3	P49209	RPL9C	22 kDa	2	2	10
136	60S ribosomal protein L8-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL8A PE=1 SV=2	P46286	RPL8A	28 kDa	3	3	8
137	60S ribosomal protein L6-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL6A PE=2 SV=1	Q9FZ76	RPL6A	26 kDa	5	5	9
138	60S ribosomal protein L5-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL5B PE=2 SV=3	P49227 (+1)	RPL5B	34 kDa	5	5	10
139	60S ribosomal protein L3-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ARP1 PE=1 SV=5	P17094	ARP1	45 kDa	4	5	16
140	60S acidic ribosomal protein P2-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPP2B PE=1 SV=1	Q9SLF7	RPP2B	11 kDa	2	2	3
141	50S ribosomal protein L12-1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL12A PE=2 SV=1	P36210 (+1)	RPL12A	20 kDa	4	2	11
142	50S ribosomal protein L6, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPL6 PE=2 SV=1	O23049	RPL6	25 kDa	4	2	9
143	30S ribosomal protein S19, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=rps19 PE=3 SV=1	P56808	rps19	11 kDa	3	3	2

144	30S ribosomal protein S9, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=RPS9 PE=2 SV=1	Q9XJ27	RPS9	23 kDa	4	2	2
145	20 kDa chaperonin, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPN20 PE=1 SV=2	O65282	CPN20	27 kDa	7	3	14
146	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MS2 PE=1 SV=1	Q9SRV5	MS2	85 kDa	16	14	10
147	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase 1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=MS1 PE=1 SV=1	O50008	MS1	84 kDa	20	17	15
148	3-isopropylmalate dehydrogenase OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=IMD1 PE=1 SV=1	B9DHH9 (+1)	IMD1	42 kDa	4	2	2
149	2-Cys peroxiredoxin BAS1-like, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=At5g06290 PE=2 SV=3	Q9C5R8 (+1)	At5g0629 0	30 kDa	2	2	4
150	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=BAS1 PE=1 SV=2	Q96291	BAS1	29 kDa	6	5	5

Table S2. 3. Carbonylated proteins specifically identified in the untreated and H₂O₂-treated plant samples

UNTREATED SAMPLES, T0			
#	Accession number	ID gène	Proteins Names
1	Q9FZ47	AT1G16880	ACT domain-containing protein ACR11
2	O24456	AT1G18080	Receptor for activated C kinase 1A (RACK1A)
3	Q9FWR4	AT1G19570	Glutathione S-transferase DHAR1, mitochondrial
4	Q93VR4	AT1G24020	MLP-like protein 423
5	A8MRC4	AT1G30230	EF1_GNE domain-containing protein
6	B3H621	AT1G63770	Peptidase M1 family protein
7	P11574	AT1G76030	V-type proton ATPase subunit B1
8	Q38900	AT2G16600	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-1
9	Q9SKP6	AT2G21170	Triosephosphate isomerase, chloroplastic
10	O80988	AT2G26080	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) 2, mitochondrial
11	P46421	AT2G29450	Glutathione S-transferase U5
12	Q5GM68	AT2G42600	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2
13	P47999	AT2G43750	Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic
14	O22914	AT2G47400	Calvin cycle protein CP12-1, chloroplastic
15	A0A1I9LT02	AT3G03250	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
16	A0A1I9LSZ7	AT3G13920	Eukaryotic translation initiation factor 4A1
17	Q39061	AT3G52380	RNA-binding protein CP33, chloroplastic
18	Q9SE60	AT3G59970	Methylenetetrahydrofolate reductase 1
19	Q9S757	AT3G61440	Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase C1, mitochondrial
20	O04603	AT4G01310	50S ribosomal protein L5, chloroplastic
21	P42643	AT4G09000	14-3-3-like protein GF14 chi
22	P16127	AT4G18480	Magnesium-chelatase subunit ChII-1, chloroplastic
23	Q9XFT3	AT4G21280	Oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplastic
24	P54150	AT4G25130	Peptide methionine sulfoxide reductase A4, chloroplastic

25	Q9M0A7	AT4G30530	Gamma-glutamyl peptidase 1
26	P34790	AT4G38740	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP18-3
27	F4KGV2	AT5G10450	14_3_3 domain-containing protein
28	P55229	AT5G19220	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1, chloroplastic
29	A0A1P8BF32	AT5G42020	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
30	Q42403	AT5G42980	Thioredoxin H3
31	Q9LTX9	AT5G49910	Heat shock 70 kDa protein 7, chloroplastic
32	Q9SCY0	AT5G51820	Phosphoglucomutase, chloroplastic
33	F4JX83	AT5G53490	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
34	P55737	AT5G56030	Heat shock protein 90-2
35	Q9SAU2	AT5G61410	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase, chloroplastic
36	Q9XFS9	AT5G62790	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, chloroplastic
37	P56778	ATCG00280	Photosystem II CP43 reaction center protein
38	P56777	ATCG00680	Photosystem II CP47 reaction center protein
39	P56791	ATCG00830	50S ribosomal protein L2, chloroplastic

H₂O₂-TREATED SAMPLES, T20

#	Accession number	ID gene	Proteins Names
1	F4I2F8	AT1G03630	NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase
2	O23049	AT1G05190	50S ribosomal protein L6, chloroplastic
3	Q43870	AT1G19920	ATP sulfurylase 2
4	O23627	AT1G29880	Glycine-tRNA ligase, mitochondrial 1
5	Q9LQL0	AT1G32470	Glycine cleavage system H protein 3, mitochondrial
6	P11035	AT1G37130	Nitrate reductase [NADH] 2
7	Q9MA79	AT1G43670	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic
8	Q9M8M7	AT1G80600	Acetylornithine aminotransferase, chloroplastic/mitochondrial
9	Q9SIB9	AT2G05710	Aconitate hydratase 3, mitochondrial
10	Q39161	AT2G15620	Ferredoxin--nitrite reductase, chloroplastic
11	Q9SLF7	AT2G27710	60S acidic ribosomal protein P2-2
12	Q9ZUU4	AT2G37220	RNA-binding protein CP29B, chloroplastic

13	Q9SSA5	AT3G01480	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic
14	Q9SRV5	AT3G03780	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 2
15	Q9LIK9	AT3G22890	ATP sulfurylase 1, chloroplastic
16	P36210	AT3G27830	50S ribosomal protein L12-1, chloroplastic
17	Q9SD76	AT3G46970	Alpha-glucan phosphorylase 2, cytosolic
18	Q9ZR03	AT4G03280	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplastic
19	Q9SEU8	AT4G03520	Thioredoxin M2, chloroplastic
20	A0A1P8B8W6	AT4G09010	PEROXIDASE_4 domain-containing protein
21	P39207	AT4G09320	Nucleoside diphosphate kinase 1
22	Q42418	AT4G29350	Profilin-2
23	Q9STG9	AT4G34740	Amidophosphoribosyltransferase 2, chloroplastic
24	Q9SZJ5	AT4G37930	Serine hydroxymethyltransferase 1, mitochondrial
25	Q03251	AT4G39260	Glycine-rich RNA-binding protein 8
26	Q9C5R8	AT5G06290	2-Cys peroxiredoxin BAS1-like, chloroplastic
27	Q43316	AT5G08280	Porphobilinogen deaminase, chloroplastic
28	F4KGU2	AT5G10360	Ribosomal protein S6e
29	Q9LYG3	AT5G11670	NADP-dependent malic enzyme 2
30	Q9SCX3	AT5G19510	Elongation factor 1-beta 2
31	Q9FNF2	AT5G24300	Starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic
32	Q940B0	AT5G27850	60S ribosomal protein L18-3
33	P10796	AT5G38430	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit 1B, chloroplastic
34	Q96533	AT5G43940	Alcohol dehydrogenase class-3
35	F4KHY7	AT5G65430	14_3_3 domain-containing protein

CHAPITRE III

IMPACT DE LA CARBONYLATION SUR LA STRUCTURE ET L'ACTIVITÉ DE LA 2-CYS PEROXIREDOXINE

Georges Y. Fangue-Yapseu & Tagnon D. Missihoun

ARTICLE EN PREPARATION

3.1. Contribution des auteurs

Tagnon D. Missihoun et Georges Y. Fangue-Yapseu ont conçu la recherche. Georges Y. Fangue-Yapseu a réalisé les expériences. Georges Y. Fangue-Yapseu et Tagnon D. Missihoun ont analysé les données et rédigé le manuscrit.

3.2. Abstract

Introduction: Protein carbonylation is a non-enzymatic, irreversible post-translational modification resulting from the action of reactive oxygen species (ROS: H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$) or reactive carbonyl species (RCS: 2-hexenal, acrolein, 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, etc.) on the side chains of specific amino acids (Pro, Thr, Arg, Lys, His, Cys). This study explores the impact of carbonylation on the structure, stability, and enzymatic activity of *Arabidopsis thaliana* 2-Cys peroxiredoxin (2-CysPrx or 2cp). This chloroplast protein, which is encoded by two nuclear genes (2cpA and 2cpB) and is known for its peroxidase and chaperone activities, was identified in our previous work as one of the proteins sensitive to carbonylation in response to abscisic acid and H_2O_2 . This led us to question the potential impact of carbonylation on the protein structure and activity.

Methods: The 2cpA and 2cpB genes were isolated from *A. thaliana* (Col-0) leaves, inserted into the plasmid pET28-a, and then expressed in an *E. coli* bacterial strain BL21. Subsequently, protein carbonylation was induced *in vitro* using 50 μM 2-hexenal and acrolein. The alterations in native conformation resulting from protein binding with the two α,β -unsaturated aldehydes were examined through spectrofluorimetry, and the molecular size distribution and protein aggregation were evaluated by means of the dynamic light scattering (DLS) technique. The protein peroxidase activity was examined

by monitoring NADPH oxidation at 340 nm in the presence of thioredoxin and thioredoxin reductase.

Results and discussion: The carbonylation of recombinant 2cpA and 2cpB proteins with 2-hexenal and acrolein causes significant changes in the native conformation, molecular size distribution, and aggregation behavior. Despite these structural alterations, the proteins exhibit enzymatic activity with lower efficiency and a slower catalytic rate than native proteins. Additionally, the carbonylated proteins exhibit chaperone and antioxidant activity, protecting *A. thaliana* genomic DNA against oxidative stress induced by H₂O₂ and FeCl₃. This suggests that 2cpA and 2cpB are resistant to the covalent modification of peroxidative cysteine by 2-hexenal and acrolein. However, carbonylation with 2-hexenal increases the sensitivity of 2cpA and 2cpB to proteasomal degradation, demonstrating that carbonylation plays an important role in molecular homeostasis. Our results demonstrate that although carbonylation induced by α,β -unsaturated aldehydes affect the structure and stability of 2cpA and 2cpB, it does not completely inhibit their functional capabilities. Thus, our results offer a new perspective on the role of carbonylation in regulating protein activity under oxidative stress.

Key words: 2-Cys peroxiredoxin, reactive carbonyl species, carbonylation, dynamic light scattering, spectrofluorimetry.

3.3. Résumé

Introduction : La carbonylation des protéines est une modification post-traductionnelle non enzymatique et irréversible résultant de l'action d'espèces réactives de l'oxygène (ERO : H₂O₂, O₂⁻, [•]OH) ou d'espèces carbonylées réactives (RCS, *reactive carbonyl species* : 2-hexenal, acroléine, 4-hydroxynonéal, malondialdéhyde, etc.) sur les chaînes latérales d'acides aminés spécifiques (Pro, Thr, Arg, Lys, His et Cys). Dans cette étude, nous explorons l'impact de la carbonylation sur la structure, la stabilité et l'activité enzymatique de la 2-Cys peroxirédoxine d'*Arabidopsis thaliana* (2-CysPrx ou 2cp). Cette protéine chloroplastique codée par deux gènes nucléaires (2cpA et 2cpB) et connue pour ses activités de peroxydase et de chaperonne, a été identifiée dans nos travaux précédents parmi les protéines sensibles à la carbonylation en réponse à l'acide abscissique et au H₂O₂.

Cela nous a amené à nous interroger sur l'impact potentiel de la carbonylation sur la structure et l'activité des protéines.

Méthodes : Les gènes de la 2cpA et de la 2cpB ont été isolés des feuilles d'*A. thaliana* (Col-0), insérés dans le plasmide pET28-a, puis exprimés dans la souche bactérienne *E. coli* BL21. La carbonylation des protéines a ensuite été induite *in vitro* avec 50 μ M de 2-hexenal et d'acroléine. Les changements de la conformation native induits par la carbonylation des protéines avec les deux aldéhydes α,β -insaturés ont été analysés par spectrofluorimétrie, et la distribution de la taille moléculaire et l'agrégation des protéines ont été évaluées par la technique de la diffusion dynamique de la lumière (DLS). L'activité peroxydase des protéines a été examinée en suivant l'oxydation du NADPH à 340 nm en présence de la thiorédoxine et de la thiorédoxine réductase.

Résultats et discussion : La carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine induit des changements significatifs de la conformation native, la distribution de la taille moléculaire et le comportement d'agrégation des protéines recombinantes 2cpA et 2cpB. Malgré ces altérations structurales, les protéines exhibent une activité enzymatique, mais avec une efficacité et une vitesse catalytique plus faible que les protéines natives. Aussi, les protéines carbonylées exécutent une activité chaperonne et antioxydante en protégeant l'ADN génomique d'*A. thaliana* contre le stress oxydatif induit avec le H_2O_2 et le $FeCl_3$, suggérant ainsi que la 2cpA et la 2cpB sont résistantes à l'inactivation de la cystéine peroxydatique par le 2-hexenal et l'acroléine. Toutefois, la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine augmente la sensibilité de la 2cpA et de la 2cpB à la dégradation par le protéasome, montrant ainsi que la carbonylation joue un rôle important dans l'homéostasie moléculaire. Nos résultats montrent ainsi que, bien que la carbonylation induite par les aldéhydes α,β -insaturés affecte la structure et la stabilité de la 2cpA et de la 2cpB, elle n'inhibe pas complètement leurs capacités fonctionnelles. Nos résultats proposent ainsi une nouvelle perspective sur le rôle de la carbonylation dans la régulation de l'activité des protéines sous stress oxydatif.

Mots clés : 2-Cys peroxirédoxine, espèces carbonylées réactives, carbonylation, diffusion dynamique de la lumière, spectrofluorimétrie.

3.4. Introduction

La carbonylation des protéines est un processus biologique qui se produit dans tous les organismes vivants. Cette modification post-traductionnelle non enzymatique et irréversible survient lorsque les protéines sont exposées à des espèces réactives de l'oxygène (ERO : H_2O_2 , O_2^\cdot , $^\cdot\text{OH}$) ou à des dérivés carbonylés réactifs (RCS, *reactive carbonyl species*: 2-hexenal, malondialdéhyde, acroléine, 4-hydroxynonanal, etc.) produits par la peroxydation des lipides (Colombo et al., 2016 ; Tola et al., 2021). Chez les animaux et les humains, la carbonylation des protéines est reconnue comme un indicateur clé du stress oxydatif (Fritz et Petersen, 2011 ; Fedorova et al., 2014). En effet, il est estimé que jusqu'à 30% des protéines dans les cellules âgées sont carbonylées (Starke-Reed et Oliver, 1989), ce qui renforce l'idée que la carbonylation contribue au vieillissement des organismes. Par ailleurs, des estimations faites sur des hépatocytes de rats traités avec de l'oxygène montrent que 65 contre 35% des protéines sont carbonylées respectivement chez les vieux et les jeunes rats, montrant ainsi la sensibilité des organismes âgés à la carbonylation (Starke-Reed et Oliver, 1989). La télomérase, une protéine connue pour son rôle dans la protection des télomères de l'ADN contre la dégradation au cours de la division cellulaire, est l'une des protéines les plus sensibles à la carbonylation malgré sa faible abondance dans les cellules (De Graff et al., 2016). Des études suggèrent également que la carbonylation peut conduire à l'agrégation des protéines, affectant leur fonction et leur stabilité, ce qui est associé à diverses maladies dégénératives et malignes (Combes et al., 2020). Cependant, la carbonylation des protéines n'est pas toujours néfaste pour l'organisme. Par exemple, la carbonylation de la protéine Keap1 par le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sur les résidus de cystéines (Cys273 et Cys288) a pour effet de libérer le facteur de transcription nucléaire Nrf2 (NUCLEAR FACTOR ERYTHROID-2-RELATED FACTOR 2). Ce dernier contrôle l'expression des gènes antioxydants et cytoprotecteurs via la séquence régulatrice appelée éléments de réponse antioxydant (Curtis et al., 2012).

Contrairement aux animaux, les effets de la carbonylation des protéines chez les végétaux sont très peu connus. Cependant, des études révèlent que l'accumulation des RCS chez les plantes participe à des processus biologiques tels que la formation des racines latérales dans la voie de signalisation de l'auxine (Biswas et al., 2019), la fermeture des

stomates dans la voie de signalisation de l'ABA et du MeJA (Islam et al., 2016, 2020), et le retard de croissance des plantes dans les conditions de stress salin (Sultana et al., 2024). L'utilisation de la carnosine, un inhibiteur de la carbonylation, a permis de supprimer les effets des RCS, montrant ainsi l'impact de la carbonylation des protéines sur ces processus physiologiques (Biswas et Mano, 2016 ; Mano et al., 2019 ; Biswas et al., 2019 ; Biswas et Mano, 2021). Dans nos travaux précédents, nous avons identifié de nombreuses protéines spécifiquement carbonylées dans les feuilles d'*A. thaliana* en réponse à l'ABA et au H₂O₂ (Fangue-Yapseu et al., 2022; Jaballi et Missihoun, 2022). Parmi ces protéines, la 2-Cys peroxyrédoxine (2-CysPrx ou 2cp), une peroxydase thiol-dépendante largement connu pour son rôle dans la détoxification du H₂O₂, a été identifiée, ce qui nous a amené à nous interroger sur l'impact de sa carbonylation dans la régulation du mécanisme redox chez les plantes.

La 2-CysPrx est une protéine chloroplastique codée par le noyau (König et al., 2003). Chez *A. thaliana*, elle est codée par deux gènes, la 2-CysPrxA (ou 2cpA) et la 2-CysPrxB (ou 2cpB). La 2cpA et la 2cpB partagent 85% d'identité de séquence et exercent la même fonction biologique (Yang et al., 2018). La 2-CysPrx possède deux résidus de cystéines caractéristiques qui lui confèrent une forte activité peroxydase : la cystéine peroxydatique, qui réduit le peroxyde, et la cystéine résolutive, qui forme ensuite une liaison disulfure interchaîne avec la cystéine peroxydatique oxydée (Barranco-Medina et al., 2009; Pulido et al., 2010). Cette protéine contribue à la protection des plantes contre le stress oxydatif et joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie redox (Pulido et al., 2010; Cerveau et al., 2016; Yoshida et al., 2018). Par ailleurs, elle contrôle la photosynthèse, le métabolisme des sucres et des acides aminés (Müller et al., 2017), exhibe une activité chaperonne en cas de stress oxydatif, et participe à la transduction du signal des ERO (Cerveau et al., 2016; Liebthal et al., 2018). La 2-CysPrx est donc une protéine qui joue un rôle crucial dans la survie de la cellule, particulièrement dans les conditions de stress oxydatif. C'est pourquoi sa carbonylation en réponse au H₂O₂ et à l'ABA nous a amené à réaliser ces travaux de recherche pour examiner l'impact de sa carbonylation dans la réponse contre le stress oxydatif. Ainsi, nous explorons dans cette étude l'impact de la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine sur la structure, la stabilité et l'activité de la 2cpA et de la 2cpB d'*A. thaliana*. Nous avons choisi les aldéhydes α,β -insaturés comme

agent de carbonylation du fait que les groupements thiols des cystéines ne sont pas sensibles à l'oxydation directe par les ERO. À travers une combinaison d'analyses *in silico*, de simulations de dynamique moléculaire et d'expériences *in vitro*, nous examinons comment la carbonylation affecte la conformation native, le comportement d'agrégation, la stabilité thermique, les activités enzymatique, chaperonne et antioxydante, ainsi que la sensibilité au protéasome de la 2cpA et de 2cpB. Nos résultats montrent que la carbonylation avec les aldéhydes α,β -insaturés module la structure et les propriétés biologiques de la 2cpA et de la 2cpB sans toutefois entraîner leur désactivation, mettant ainsi en exergue la complexité de l'impact de la carbonylation sur la stabilité et l'activité des protéines dans les contextes de stress oxydatif.

3.5. Matériel et méthodes

3.5.1. Analyse *in silico* de l'impact de la carbonylation sur la structure et la stabilité de la 2-CysPrx

3.5.1.1. Amarrage moléculaire

Pour identifier *in silico* les résidus Lys, His et Cys qui sont de potentiels sites de la carbonylation de la 2-CysPrx par les RCS, nous avons utilisé la structure cristalline de la 2-CysPrxA (2cpA) d'*A. thaliana* (PDB, Protein Data Bank : 5ZTE) (Yang et al., 2018) et les structures 3D du 2-hexenal et de l'acroléine disponibles dans les bases de données « Protein Data Bank » et « PubChem », respectivement. Le 2-hexenal et l'acroléine sont des aldéhydes α,β -insaturés très réactif. Concernant la protéine, la chaîne A du pentamère a été sélectionnée à l'aide du logiciel Discovery Studio Visualizer ou DSV (BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer, v21. 1.0. 20298; San Diego CA, USA: Dassault Systèmes, 2021) pour l'étude avec le monomère, et les chaînes D et E pour l'étude avec le dimère. La protéine a été préparée à l'aide des outils AutoDock avec l'ajout d'hydrogènes polaires et le calcul des charges de Gasteiger (Morris et al., 1996). Enfin, le format PDB (protein data bank) de la protéine a été convertie en format PDBQT (Protein Data Bank with partial charge Q and atom type T) pour l'amarrage moléculaire. Pour la préparation des deux aldéhydes α,β -insaturés, les formats SDF (Structured Data File) du 2-hexenal et de l'acroléine ont été convertis en formats PDB à l'aide du logiciel Open Babel (<https://openbabel.org>). Les charges d'hydrogènes polaires ont été attribuées

et les hydrogènes non polaires ont été fusionnés à l'aide des outils AutoDock (Morris et al., 1996). Enfin, les fichiers PDB des deux aldéhydes ont été convertis en format PDBQT pour l'amarrage moléculaire. Pour déterminer les poches de la 2cpA renfermant les résidus Cys, Lys et His qui sont de potentiels sites de fixation du 2-hexenal et de l'acroléine, un amarrage moléculaire à l'aveugle a été effectué à l'aide du logiciel AutoDock Vina (Trott et Olson, 2010). La grille de la boîte a été définie pour englober la plus grande partie de la structure de la protéine. Pour l'étude avec le monomère, les coordonnées de la boîte étaient : centres : X = 53,807, Y = 177,378, Z = 57,874, et 126, 126, 104 sur les axes X, Y et Z. Pour l'étude avec le dimère, les coordonnées de la boîte étaient : centres : X = 76,486, Y = 98,936, Z = 55,107, et 126, 126, 104 sur les axes X, Y et Z. Pour valider notre méthode, nous avons effectué l'amarrage moléculaire à l'aveugle du H₂O₂ avec la 2-CysPrx. Ceci a permis de vérifier que ce ligand naturel se fixe bien dans la poche catalytique prédite à partir de la structure cristalline de la 2cpA. Les interactions des structures amarrées ont été examinées sur le serveur ProteinPlus (<https://protein.plus/>) (Schöning-Stierand et al., 2020) et/ou avec DSV.

3.5.1.2. Simulation moléculaire dynamique

Les résidus Lys, His et Cys contenus dans les poches protéiques identifiées grâce à l'amarrage moléculaire ont été désigné comme des sites potentiels de la carbonylation de la 2cpA par le 2-hexenal et l'acroléine lorsque la distance entre le groupe fonctionnel réactif du résidu (ϵ -amine ou thiol) et le C $_{\beta}$ de l'aldéhyde était inférieur à 4 Å. Pour carbonyler ces résidus avec les deux aldéhydes α,β -insaturés, nous avons exploité le mécanisme de la réaction d'addition de Michael (Michael, 1887). Il s'agit d'une réaction d'addition conjuguée où les groupes fonctionnels réactifs des résidus Lys (ϵ -amine), His (ϵ -amine du noyau imidazole) et Cys (thiol) s'additionnent sur le C $_{\beta}$ de la double liaison du 2-hexenal et de l'acroléine. Cela entraîne la formation irréversible d'une nouvelle liaison covalente (azote-carbone ou soufre-carbone) modifiant la structure et les propriétés physico-chimiques de base du résidu. Dans cette étude, les structures carbonylées des résidus identifiés comme sites potentiels de la carbonylation de la 2cpA par le 2-hexenal et l'acroléine ont été générées avec DSV, et leurs structures ont été optimisées à l'aide du champ de force rapide de type Dreiding. Nous avons ensuite utilisé le logiciel « MyPresto

Portal » (Medicinally Yielding Protein Engineering SimulaTOr, IMSBIO CO., Ltd. Tokyo) (<https://www.mypresto5.jp/>) qui permet d'exécuter le programme GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations) sous Windows (Bekker et al., 1993), pour examiner la simulation moléculaire dynamique (MD) de la protéine native et des protéines carbonylées. La simulation MD a été effectuée en utilisant la méthode « Autodynamique ». Brièvement, le système a été initialement réduit deux fois avec un maximum de 5 000 étapes, après quoi, il a été exposé deux fois à l'équilibre NVT [i.e. que le nombre de particules (N), le volume (V) et la température (T) sont constants] pendant 20 000 000 d'étapes (soit 40 ns) à 300 °K. Toutes les simulations MD ont été exécutées sur un système d'exploitation Microsoft Windows 10 Enterprise version H21 sur un processeur Intel(R) Core(TM) i5-4570 CPU @ 3.20 GHz avec 8,0 Go de RAM sur une machine CIARATECH (CIARA Technologies, USA). Enfin, nous avons effectué une analyse détaillée des trajectoires de la simulation MD des protéines en se concentrant sur l'écart quadratique moyen (RMSD, *Root Mean Square Deviation*), les fluctuations quadratiques moyennes (RMSF, *Root Mean Square Fluctuation*) et le rayon de giration (Rg). Le RMSD (i.e. la distance moyenne entre les atomes des structures superposées) a été calculé après un ajustement par la méthode des moindres carrés au squelette de la protéine.

3.5.2. Analyse *in vitro* de l'impact de la carbonylation sur la structure, la stabilité et l'activité de la 2-CysPrx

3.5.2.1. Expression hétérologue de la 2cpA et de la 2cpB

Chez *A. thaliana*, la 2-CysPrx est codée par deux gènes nucléaires A et B et les deux protéines (2cpA et 2cpB) partagent 85% d'identité de séquence et exercent la même fonction biologique (Yang et al., 2018). Nous avons exprimé la 2cpA et la 2cpB sous forme de protéines recombinantes marquées par une queue histidine (6X-His-Tag) en utilisant le vecteur pET28a et les cellules bactériennes *E. coli* BL21. Les ADNc des deux gènes ont été synthétisés à partir de l'ARNm des feuilles d'*A. thaliana* (Col-0), puis intégrés entre les sites BamHI et XhoI du vecteur pET28a. Les amorces utilisées étaient les suivantes :

2cpA-f : aagcggatccATGGCGTCTGTTGCTTCTTCAACTAC,

2cpA-r : cggcctcgagCTAAATAGCTGAGAAGTACTCTTTGC,

2cpB-f : tagcggatccATGTCAATGGCGTCTATAGCTTCTTC,

2cpB-r : cggcctcgagCTAGATAGCTGAAAAGTATTCTTTGC.

3.5.2.2. Production et purification des protéines recombinantes

Pour la production et la purification de la 2cpA et de la 2cpB, nous avons utilisé la méthode de Liebthal et al., (2016) avec quelques modifications. Brièvement, 1 L de milieu de culture LB (Luria-Bertani, Fisher Scientific) contenant 50 µg/mL de kanamycine a étéensemencé avec 10 mL de culture bactérienne non induite pendant la nuit et a été cultivé à 37 °C jusqu'à une $DO_{600} = 0,6-0,8$. L'expression de la protéine recombinante a été induite à 30 °C par ajout de 1 mM d'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG). Après 4 h de culture, les culots cellulaires obtenus par centrifugation pendant 30 min à 12 000 rpm, à 4 °C, ont été stockés à -20 °C pour des utilisations ultérieures. Pour la purification, les culots ont été suspendus pendant 1 h à 4 °C et sous agitation dans un tampon A (50 mM NaH₂PO₄, 10% glycérol, 0,1% Tween-20, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8,0) supplémenté de lysozyme et d'acide ascorbique. La solution a été agitée à 4 °C pendant 1 h, puis soniquée et les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation (30 min, 12 000 rpm, 4 °C). Les surnageants ont ensuite été chargés sur une colonne Ni-NTA (QIAGEN) préalablement équilibrée avec 9 volumes de colonne de tampon A. Après 1 h d'incubation à 4 °C, la résine a été lavée avec 20 mM d'imidazole dans le tampon A, pour un total de 21 volumes de colonne. La protéine recombinante a été éluée avec 250 mM d'imidazole dans le tampon A. Les deux protéines recombinantes purifiées ont ensuite été transférées dans du tampon phosphate (pH 7,4) par ultracentrifugation à l'aide des filtres à centrifuger Amicon Ultra-4 mL (seuil de 10 kDa ; Millipore Sigma).

3.5.2.3. Analyse western blot

La production hétérologue de la 2cpA et de la 2cpB a été validée par western blot. Brièvement, après la séparation sur un gel de polyacrylamide 12,5% en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE), les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Le premier anticorps, l'anti-His-Tag de souris (Thermo Fisher) à la dilution de 1:10 000, a été lié à la membrane pendant 1 h à la température ambiante. La détection de la liaison de l'anticorps secondaire (anti-souris IgG de chèvre, 1:5000 ; Millipore Sigma) conjugué à la peroxydase de raifort a été réalisée à l'aide de la

chimioluminescence améliorée (Radiance Plus, Azure, USA) acquise sur le système d'imagerie Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager (Azure Biosystems, USA).

3.5.2.4. Carbonylation des protéines avec le 2-hexenal et l'acroléine

Pour la carbonylation, la 2cpA et la 2cpB ont été diluées à une concentration de 0,2 µg/µL dans du PBS supplémenté de 10 mM de DTT, 10 mM d'EDTA et 50 µM de 2-hexenal ou d'acroléine. Les échantillons ont été incubés sous agitation pendant 1 h à 4 °C. Par la suite, les aldéhydes non liés et le DTT ont été éliminés du milieu par échange de tampon avec du PBS à l'aide des filtres à centrifuger Amicon Ultra-0.5 mL (seuil de 10 kDa ; Millipore Sigma). Pour examiner la carbonylation effective des protéines, nous les avons marquées avec la sonde fluorescente cyanine 7.5-hydrazide (Cy7.5-Hz, excitation/émission : 784/832 nm ; Lumiprobe, USA) (Fangue-Yapseu et al., 2022 ; Jaballi et Missihoun, 2022). Le marquage a été effectué à l'obscurité pendant 1 h, à la température ambiante et à 500 rpm à l'aide du ThermoMixer Eppendorf F1.5 (Millipore Sigma). La réaction contenait 0,2 µg/µL de protéine, 7 mM de cyanoborohydrure de sodium et 62,5 pmol/µL de Cy7.5-Hz. Les échantillons marqués ont été analysés par SDS-PAGE et leur fluorescence a été mesurée avec le scanner « Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager ».

3.5.2.5. Analyse de la conformation native des protéines carbonylées

Pour examiner l'impact de la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine sur la conformation native de la 2cpA et de la 2cpB, nous avons mesuré la fluorescence intrinsèque des protéines via leurs résidus de tryptophane (Trp) à l'aide du spectrophotomètre à fluorescence Cary Eclipse. En effet, les Trp sont des fluorophores sensibles à leur environnement local et peuvent indiquer des changements de conformation des protéines (Brockhinke et al., 2000; Ghisaidoobe and Chung, 2014). Dans le cas de la 2cpA d'*A. thaliana*, la structure cristalline montre les Trp aux positions 154 et 245, respectivement (Yang et al., 2018). Le Trp154 est logé dans le cœur de la protéine (hélix α -3) et est dirigé vers le site actif où se trouve la cystéine peroxydatique (C_P, Cys119). Quant au Trp245, il est logé dans la région C-terminale à proximité de la cystéine résolutive (C_R, Cys241). Ces deux Trp sont idéals pour examiner les changements de conformation de la protéine, ainsi que l'impact de ces modifications sur l'interaction de la protéine avec

son substrat. Pour les analyses, nous avons dilué les échantillons de protéines dans du PBS (pH 7,4) aux concentrations de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Les spectres d'émission ont été mesurés entre 295 et 450 nm, avec une longueur d'onde d'excitation de 280 nm. La largeur de la fente était de 10 nm pour l'excitation et l'émission.

3.5.2.6. Analyse de la distribution de la taille des protéines carbonylées

Les 2-CysPrx typiques (exemples de la 2cpA et de la 2cpB d'*A. thaliana*) fonctionnent comme des dimères (α_2) en tant qu'unité structurale élémentaire et ces dimères ont une forte propension à former des décamères [$(\alpha_2)_5$] (Dietz, 2011; Yang et al., 2018). Sous le contrôle du statut redox et d'autres modifications post-traductionnelles, ces deux structures de bases peuvent adopter différentes conformations dont celles du dimère réduit/oxydé, du décamère réduit/hyperoxydé et des agrégats de masse élevée de décamères hyperoxydés (Dietz, 2011). Ainsi, on peut retrouver dans une solution de 2-CysPrx différentes formes de faible poids moléculaire, ainsi que différents complexes de haut poids moléculaire selon les caractéristiques de l'environnement (pH, présence de réducteurs/oxydants, température, etc.). Ces différentes particules de la 2-CysPrx possèdent des caractéristiques physico-chimiques (taille, charge, coefficient de diffusion, etc.) qui facilitent leur analyse avec des outils de biologie moléculaire. Ainsi, pour examiner l'impact de la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine sur la distribution en solution de la taille des particules de la 2cpA et de la 2cpB avant et après hyperoxydation, nous avons employé la technique de la diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*) avec l'appareil DynaPro Nanostar (Wyatt Technology). Cette technique rapide et non invasive nous a également permis d'examiner la stabilité thermique des particules de protéines dans les différents échantillons en utilisant la « méthode automatique de balayage thermique, avec un incrément de température de 1 °C ». Le balayage thermique a été réalisé de 20 à 70 °C. Pour l'analyse de la taille des particules de protéines dans les échantillons, nous avons utilisé la « méthode automatique de mesure par lot à température constante, 25 °C ». L'acquisition des données a été effectuée avec des échantillons de protéines dilués à une concentration de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans le tampon phosphate (pH 7,4).

3.5.2.7. Analyse de l'activité enzymatique des protéines carbonylées

Les 2-CysPrx exécutent une activité peroxydase lorsqu'elles sont sous leurs formes de faible poids moléculaire (Lee, 2005; An et al., 2010; Dietz, 2011); les dimères et les pentamères étant les unités fonctionnelles de base (Dietz, 2011). Les complexes de haut poids moléculaire exécutent plutôt une activité chaperonne (An et al., 2010; Dietz, 2011). Ainsi, pour examiner l'impact de la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine sur l'activité enzymatique de la 2cpA et de la 2cpB, nous avons réduit les échantillons (0,2 µg/µL) avec du DTT (10 mM), puis nous les avons carbonylées avec 50 µM de 2-hexenal et d'acroléine. Les aldéhydes non liés et le DTT ont ensuite été éliminés du milieu par ultracentrifugation à l'aide des filtres à centrifuger Amicon Ultra-0.5 mL. Finalement, nous avons déterminé l'activité enzymatique des échantillons en examinant l'oxydation du NADPH ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en présence de la thiorédoxine (Trx) et de la thiorédoxine réductase (TrxR) d'*E. coli* (König et al., 2003; Knieper et al., 2022). Le milieu réactionnel à base de tampon phosphate (pH 7,4), contenait 10 mM d'EDTA, 200 µM de NADPH, 0,25 mM de Trx, 8 µM de TrxR et 0,2 µg/µL de 2cpA/2cpB. Après 30 min d'incubation à 30 °C, la réaction enzymatique a été déclenchée avec 300 µM de H₂O₂. L'oxydation du NADPH a été calculée 5 min après l'ajout du H₂O₂. L'absorbance mesurée à 340 nm a été corrigée en éliminant l'oxydation de fond du NADPH en l'absence de 2cpA/2cpB.

3.5.2.8. Analyse de la sensibilité des cystéines à la carbonylation

Pour examiner la sensibilité des cystéines de la 2cpA et de la 2cpB au 2-hexenal et à l'acroléine, nous avons utilisé le réactif d'Ellman ou DTNB [acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)] pour mesurer le niveau de diminution des groupements thiols libres (-SH) dans les échantillons après la carbonylation. À cet effet, les protéines natives et carbonylées ont été diluées à la concentration de 0,2 µg/µL dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M (pH 8,0) contenant 1 mM d'EDTA et 70 µg/mL de DTNB. L'absorbance a été lue à 412 nm après 15 min d'incubation à la température ambiante.

3.5.2.9. Analyse de l'activité chaperonne et antioxydante des protéines carbonylées

L'activité chaperonne des 2-CysPrx est déclenchée par des facteurs de stress environnementaux tels que la chaleur et le stress oxydatif, qui induisent des changements structuraux nécessaires pour que la protéine passe d'une fonction de peroxydase à une fonction de chaperonne (Teixeira et al., 2015; Lee et al., 2016). Dans le cas du stress oxydatif, l'hydroxydation de la cystéine peroxydatique est le facteur qui déclenche la formation de la molécule chaperonne (Dietz, 2011). La 2-CysPrx chaperonne protège les protéines clientes contre l'agrégation et les maintient dans un état de capacité de repliement jusqu'à ce que les conditions normales soient rétablies (Teixeira et al., 2015). Dans cette étude, l'activité chaperonne a été évaluée en examinant la capacité de la 2cpA et de la 2cpB, natives et carbonylées, à s'attacher à l'ADN génomique d'*A. thaliana* en présence d'une concentration élevée de H₂O₂. Brièvement, les échantillons, carbonylés et natifs, ont été dilués à la concentration de 0,2 µg/µL dans du PBS (pH 7,4) contenant 300 µM de H₂O₂ et 200 ng d'ADN. Après une incubation de 1 h, à 23 °C et à 450 rpm, la taille des complexes 2-CysPrx-ADN formés a été analysée sur un gel d'agarose à 0,7%. Pour mesurer la capacité antioxydante des protéines natives et carbonylées, les échantillons ont été dilués à la concentration de 0,2 µg/µL dans du PBS contenant 10 mM de DTT, 200 ng d'ADN et 10 mM de FeCl₃. Après une incubation à l'obscurité pendant 1 h, à 23 °C et à 450 rpm, la dégradation de l'ADN génomique a été examinée sur un gel d'agarose à 0,7%.

3.5.2.10. Évaluation de la dégradation des protéines carbonylées par le protéasome

Pour examiner la sensibilité à la dégradation par le protéasome des protéines recombinantes 2cpA et 2cpB carbonylées, nous avons utilisé un complexe protéasomique extrait des feuilles d'*A. thaliana* double mutant pour les gènes de la 2cpA et de la 2cpB. Brièvement, 1 g de feuilles a été broyé dans des tubes Eppendorf de 2 mL à l'aide de billes et d'azote liquide. Au broyat, 300 µL de tampon phosphate 50 mM (pH 7,0) contenant 2 mM de MgCl₂ et 5% de glycérol ont été ajoutés. L'ATP a été exclu du tampon d'extraction pour enrichir l'extrait en protéasome 20S (Li et al., 2015). Le mélange a été incubé à 4 °C pendant 10 min avec une agitation au vortex toutes les 2 min, puis centrifugé à 8 000 g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant obtenu a été clarifié par centrifugation à 14 000 g

pendant 15 min à 4 °C. Pour ensuite évaluer la dégradation des protéines carbonylées par l'extrait de protéasome, 0,2 µg/µL de chaque échantillon de protéine ont été incubé dans du PBS (pH 7,4) pendant 1 h, à 30 °C et à 450 rpm, avec 0,2 µg/µL d'extrait protéasomique (rapport 1:1). La dégradation des protéines carbonylées a également été suivie en présence de 1 µM de MG132 (inhibiteur de protéasome). Après l'incubation, les échantillons ont été examinés en condition dénaturante sur un gel de polyacrylamide à 12,5%. Les protéines ont été colorées avec le Coomassie et les images ont été acquises avec le scanner « Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager ».

3.5.2.11. Analyses statistiques

Toutes les données ont été obtenues lors de plusieurs expériences indépendantes utilisant des échantillons de protéines provenant de différentes purifications. Elles sont présentées sous forme de moyennes ± écart type. La signification a été calculée à l'aide du test de Tukey au seuil de probabilité $p < 0,05$.

3.6. Résultats

3.6.1. Les résidus Cys119, Cys241 et His208 sont des cibles potentielles de la carbonylation de la 2cpA par le 2-hexenal et l'acroléine

Pour identifier les résidus de Cys, Lys et His de la 2-CysPrx pouvant être carbonylés par des RCS, nous avons exécuté un amarrage moléculaire à l'aveugle avec le monomère et le dimère de la protéine en utilisant la structure cristalline de la 2cpA (PDB : 5ZTE) et les structures 3D du 2-hexenal et de l'acroléine. Notre méthode a été validée par l'ancrage effectif du H₂O₂ dans la poche catalytique prédite à partir de la structure cristalline de la 2cpA. L'interaction moléculaire 2cpA-H₂O₂ a été visualisée sur le serveur « ProteinPlus ». Le score de l'ancrage est de -3,0 kcal/mol avec le monomère (**Figure 3.1A-i**) et -3,1 kcal/mol avec le dimère (**Figure 3.2A-i**). Les résidus Thr116, Phe117, Val118, Cys119 et Arg195 participent à la fixation du H₂O₂ dans la poche catalytique du monomère et dans celles du dimère (**Figure 3.1A-ii ; Figure 3.2A-ii**).

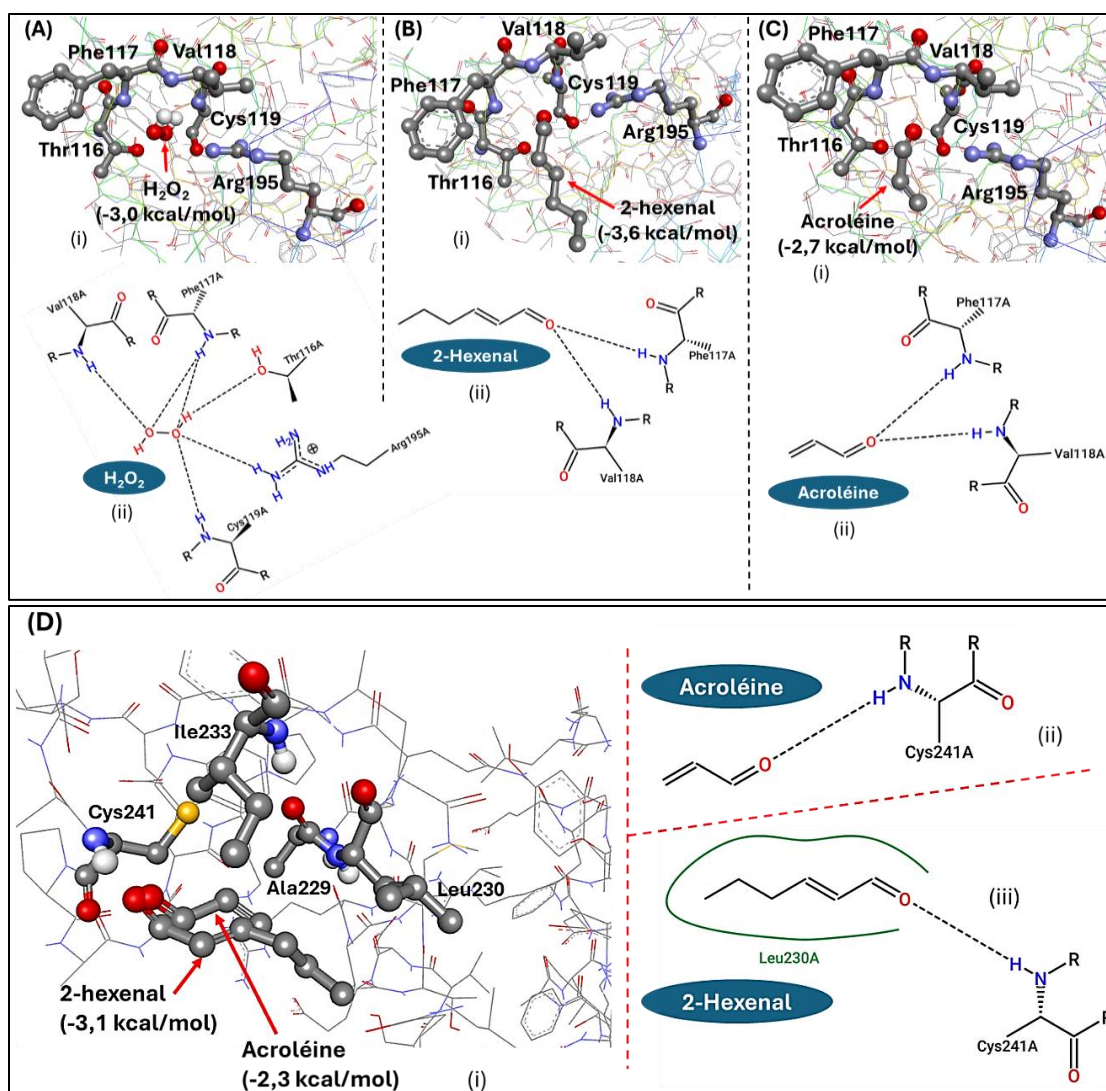


Figure 3. 1 : L'amarrage moléculaire 2cpA-RCS avec le monomère désigne les résidus Cys119 et Cys241 comme des sites potentiels de la carbonylation de la protéine par le 2-hexenal et l'acroléine. (A-C) Le H₂O₂, le 2-hexenal et l'acroléine se fixent dans la poche catalytique de la 2cpA avec des scores de -3,0, -3,6 et -2,7 kcal/mol, respectivement (i). Les résidus Thr116, Phe117, Val118, Cys119 et Arg195 fixent le H₂O₂ dans la poche catalytique (A-ii), tandis que les résidus Phe117 et Val118 fixent le 2-hexenal et l'acroléine dans la poche catalytique (B-ii, C-ii). La fixation du H₂O₂ dans la poche catalytique conduit à la sulfénylation de la Cys119 au cours de l'activité catalytique. Ainsi, la fixation du 2-hexenal et de l'acroléine dans la poche catalytique peut conduire à la carbonylation de la Cys119 selon le mécanisme de la réaction d'addition de Michael (addition conjuguée du 2-hexenal/acroléine via leur C_β sur l'atome de soufre du résidu Cys119). (D) Le 2-hexenal et l'acroléine se fixent également dans une poche non catalytique où se trouve le résidu Cys241 avec des scores de -3,1 et de -2,3 kcal/mol, respectivement (i). La Cys241 participe à la liaison du 2-hexenal et de l'acroléine avec la 2cpA (ii-iii) et pourrait ainsi se retrouver carbonylée.

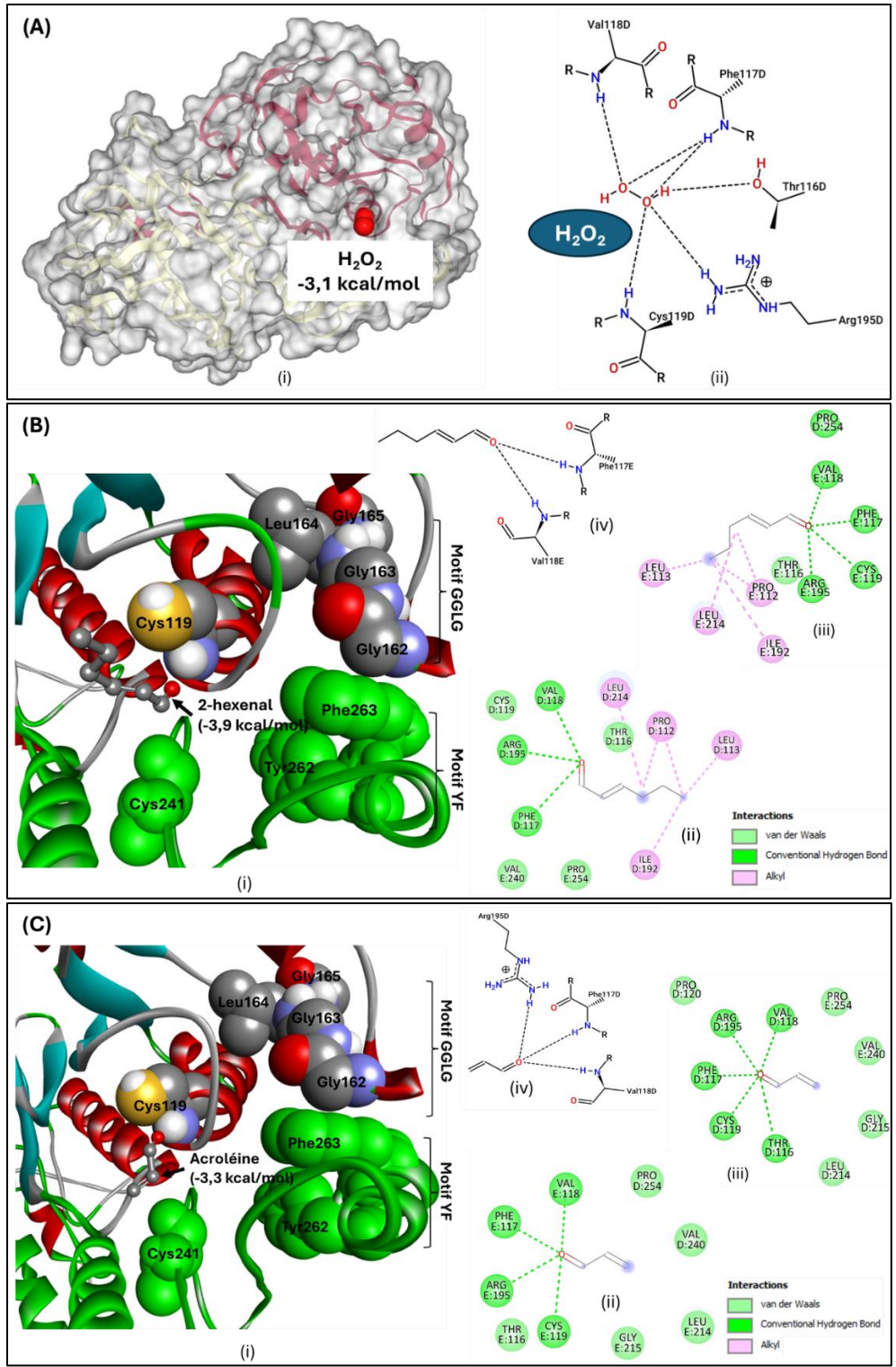


Figure 3. 2 : L'amarrage moléculaire 2cpA-RCS avec le dimère désigne le résidu Cys119 des monomères qui le compose comme un site prioritaire de la carbonylation de la protéine par le 2-hexenal et l'acroléine. (A-C) Le H_2O_2 , le 2-hexenal et l'acroléine se fixent dans les poches catalytiques du dimère de la 2cpA avec des scores de -3,1, -3,9 et -3,3 kcal/mol, respectivement (i). Les résidus Thr116, Phe117, Val118, Cys119 et Arg195 fixent le H_2O_2

dans les poches catalytiques (A-ii), tandis que les résidus Phe117 et Val118 fixent le 2-hexenal et l'acroléine dans les poches catalytiques (B-ii-iv, C-ii-iv). La figure A-i a été générée sur le serveur « ProteinPlus ». Elle montre la position de la poche catalytique. Les deux monomères sont présentés à l'intérieur de la surface par des couleurs différentes. Les figures B-i et C-i ont été générées par le logiciel DSV. L'un des monomères est représenté en vert. Les résultats montrent que la carbonylation des deux résidus Cys119 du dimère par le 2-hexenal et l'acroléine est probable malgré la présence des motifs YF (Tyr262-Phe263) et GGLG (Gly162-Gly163-Leu164-Gly165) qui créent des encombrements stériques pour assurer le maintien de l'intégrité structurale de la protéine.

Concernant l'amarrage moléculaire 2cpA-RCS avec le monomère, nos résultats montrent que le 2-hexenal et l'acroléine se fixent dans la poche catalytique de la 2cpA avec des scores de -3,6 et -2,7 kcal/mol, respectivement (**Figure 3.1B-i, C-i ; Tableau 3.1**). L'analyse des interactions avec le logiciel DSV montre que les résidus Phe117, Val118, Cys119 et Arg195 peuvent contribuer à la liaison des deux aldéhydes dans la poche catalytique (**Tableau 3.1**). Cependant, les distances des liaisons établies entre les deux aldéhydes et les résidus Phe117 et Val118 sont plus faibles que celles établies avec les résidus Cys119 et Arg195 (**Tableau 3.1**). De ce fait, l'analyse des interactions sur le serveur « ProteinPlus » montre que les résidus Phe117 et Val118 ont les meilleures probabilités de lier le 2-hexenal et l'acroléine dans la poche catalytique (**Figure 3.1B-ii, C-ii**).

Tableau 3. 1 : Interactions moléculaires 2cpA-RCS analysés avec DSV.

E (Kcal/mol)	Acides aminés impliqués dans les liaisons hydrogènes	Distance de la liaison hydrogène (Å)	Acides aminés impliqués dans d'autres liaisons
2cpA-2-hexenal[#]			
-3,6	Phe117, Val118, Cys119 , Arg195	2,09 – 1,95 – 2,77 – 2,46	Pro112, Leu113, Ile192, Leu214
-3,5	His208	2,30	Arg218
-3,1	Cys241	1,84	Ala229, Leu230, Ile233
-3,0	Ser251	2,08	Lys250
-2,9	Lys96	1,95	Tyr100, Lys103
2cpA-acroléine[#]			
-2,7	Phe117, Val118, Arg195	2,11 – 2,00 – 2,54	Thr116, Pro112, Cys119 , Leu214
-2,6	His208	2,61	Thr210
-2,3	Cys241	2,02	Ala229, Leu230, Ile233

#Le monomère de la protéine, le 2-hexenal et l'acroléine ont été préparés avec AutoDock et les ancrages moléculaires à l'aveugle ont été réalisés avec AutoDock Vina. Seules les interactions présentant au moins un acide aminé susceptible d'être carbonylé (Cys, Lys et His) par le 2-hexenal et l'acroléine ont été prises en compte. Les résultats montrent que les résidus Lys96, Lys103, Cys119, His208, Cys241 et Lys250 sont des sites potentiels de la carbonylation du monomère de la 2cpA par le 2-hexenal. De même, les résidus Cys119, His208 et Cys241 sont des sites potentiels de la carbonylation de la 2cpA par l'acroléine.

Sachant que la fixation du H₂O₂ dans la poche catalytique conduit à la sulfénylation du résidu Cys119 au cours de l'activité catalytique (i.e. la conversion du thiol en sulfényle : -SH en -SOH), la fixation du 2-hexenal et de l'acroléine dans cette poche catalytique entraînerait la carbonylation spontanée de ce résidu selon le mécanisme de l'addition de Michael (i.e. l'attaque du C_β de l'aldéhyde α,β-insaturé par le soufre du résidu Cys119, créant ainsi une nouvelle liaison covalente soufre-carbone dans la structure de la protéine). La Cys119 est en effet le seul résidu de la poche catalytique pouvant être carbonylé par le 2-hexenal et l'acroléine. Cependant, l'analyse des propriétés physico-chimiques de ce résidu avec DSV montre qu'il a une hydrophobicité élevée (indice d'hydrophobie, I_H = 2,5) et n'est pas accessible au solvant (surface accessible au solvant, SAS = 0) (**Tableau 3.2**). Par ailleurs, l'hydrophobicité moyenne sur la fenêtre de cinq résidus le contenant est également élevée (I_H = 1,44), suggérant ainsi que cette région de la protéine doit présenter une certaine résistance à l'approche des molécules hydrophiles comme le 2-hexenal et l'acroléine.

Tableau 3. 2 : Caractéristiques physico-chimiques des résidus identifiés comme sites potentiels de la carbonylation du monomère de la 2cpA par le 2-hexenal et/ou l'acroléine. Ces paramètres ont été déterminés avec le logiciel DSV.

	Lys96	Lys103	Cys119	His208	Cys241	Lys250
Hydrophobicité	-3,9	-3,9	2,5	-3,2	2,5	-3,9
Déplacement isotropique moyen	40,411	38,961	28,652	27,96	36,509	43,901
Localisation	Feuillet	Coude	Hélice	Feuillet	Irrégulier	Irrégulier
Hydrophobicité moyenne sur une fenêtre de 5 résidus	-0,12	-1,0	1,44	-0,74	0,68	-1,34
Accessibilité du résidu au solvant	83,255	123,252	0,0	39,075	46,558	118,342
Accessibilité de la chaîne latérale au solvant	76,012	111,311	0,0	37,565	9,124	60,855

Nos résultats montrent également que le 2-hexenal et l'acroléine se lient dans une poche non catalytique où se trouve le résidu Cys241 avec des scores de -3,1 et -2,3 kcal/mol, respectivement (**Figure 3.1D-i ; Tableau 3.1**). L'analyse des interactions sur le serveur « ProteinPlus » et avec le logiciel DSV montre que le résidu Cys241 participe à liaison de la protéine avec les deux aldéhydes (**Figure 3.1D-ii, iii ; Tableau 3.1**). Par ailleurs, la chaîne latérale de ce résidu est accessible au solvant (SAS = 9,124) et l'hydrophobicité moyenne sur la fenêtre de cinq résidus le contenant est peu élevée ($I_H = 0,68$) (**Tableau 3.2**). Ceci suggère que cette poche située dans la région C-terminale de la protéine doit avoir une faible résistance à l'approche des molécules hydrophiles.

En plus des résidus Cys119 et Cys241 qui peuvent subir la carbonylation à la suite de la liaison du 2-hexenal et de l'acroléine dans les poches protéiques où ils se trouvent, nous avons également identifié le résidu His208 comme un « bon candidat » à la carbonylation du monomère de la 2cpA par le 2-hexenal et l'acroléine (**Tableau 3.1**). Ce résidu est hydrophile ($I_H = -3,2$), sa chaîne latérale est accessible au solvant (SAS = 37,565) et la fenêtre de cinq résidus le contenant est également hydrophile ($I_H = -0,74$) (**Tableau 3.2**). Finalement, nos résultats d'analyse *in silico* avec le monomère montrent que les résidus Lys96, Lys103 et Lys250 sont également des cibles potentielles de la carbonylation de la 2cpA avec 2-hexenal (**Tableau 3.1**). Ils sont hydrophiles, accessibles au solvant, et les fenêtres de cinq résidus les contenant sont également hydrophiles (**Tableau 3.2**).

Concernant l'amarrage moléculaire 2cpA-RCS avec le dimère, nos résultats indiquent que le 2-hexenal et l'acroléine se fixent dans les poches catalytiques de la protéine avec des scores de -3,9 et -3,3 kcal/mol, respectivement (**Figure 3.2B-i, C-i**). Tout comme pour l'amarrage moléculaire 2cpA-RCS avec le monomère, l'analyse des interactions sur le serveur « ProteinPlus » et avec le logiciel DSV montre que la Phe117 et la Val118 sont les deux résidus ayant les meilleures probabilités de lier le 2-hexenal dans les deux poches catalytiques du dimère (**Figure 3.2Bii-iv**). De même, la Phe117, la Val118 et l'Arg195 sont les trois résidus avec les plus grandes probabilités de fixer l'acroléine dans les poches catalytiques du dimère (**Figure 3.2Cii-iv**). Ainsi, l'analyse avec le dimère montre que le résidu Cys119 de la poche catalytique est un site probable de la carbonylation de la 2cpA avec le 2-hexenal et l'acroléine. La proximité de la Cys241 avec la Cys119

laisse également penser que la Cys241 pourrait subir la carbonylation. La carbonylation pourrait s'opérer malgré l'encombrement stérique créée par les motifs GGLG (Gly162-Gly163-Leu164-Gly165) et YF (Tyr262-Phe263) dans l'environnement de la Cys119 et de la Cys241, respectivement. Ces deux motifs sont en effet essentiels pour le maintien de l'intégrité structurale et l'activité de la 2-CysPrx. Somme toute, les analyses d'amarrage ont montré que les résidus de cystéines impliqués dans la coordination de la structure et de l'activité de la 2-CysPrx sont des cibles potentielles du 2-hexenal et de l'acroléine, ce qui peut avoir un impact significatif sur la structure, la stabilité et l'activité de la protéine.

3.6.2. Le 2-hexenal et l'acroléine carbonylent *in vitro* la 2cpA et la 2cpB

Pour examiner expérimentalement la carbonylation de la 2-CysPrx d'*A. thaliana* avec le 2-hexenal et l'acroléine, nous avons produit les formes recombinantes de la 2cpA et de la 2cpB (**Figure 3.3A**). Les protéines recombinantes ont été analysées par SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie (**Figure 3.3B**) et par Western blot avec un anticorps anti-His-Tag (**Figure 3.3C, 3.3D**). Les analyses de Western blot ont été effectuées en condition dénaturante (**Figure 3.3C**) et native (**Figure 3.3D, i-ii**) pour examiner l'enrichissement des monomères (~30 kDa) et la distribution de la taille des structures de la 2-CysPrx (monomères, dimères, pentamères et agrégats), respectivement. Les résultats montrent que dénaturation totale et la réduction douce de la 2-CysPrx avec le DTT sont nécessaires pour l'observation sur gel des monomères (**Figure 3.3C-D**). En effet, dans l'extrait brut et les éluats réduits on distingue de nombreuses structures allant des monomères (~30 kDa) aux agrégats (> 180 kDa) de la 2-CysPrx (**Figure 3.3Di**), tandis dans l'extrait brut non réduit seuls les dimères (~60 kDa) et les agrégats sont présents (**Figure 3.3D-ii**). Pour évaluer la carbonylation des protéines, nous les avons préalablement réduites avec du DTT (10 mM) pendant 1 h, à 4 °C. Les protéines ont ensuite été carbonylées avec 25-100 µM de 2-hexenal et d'acroléine, puis marquées avec la sonde fluorescente Cy7.5-Hz pour évaluer la carbonylation. L'analyse de l'intensité de la fluorescence des bandes a révélé une augmentation significative de la carbonylation des protéines traitées par rapport aux protéines non traitées, validée par des expériences parallèles avec le BSA (**Figure 3.3E**). Par ailleurs, la concentration à 25 µM d'aldéhyde s'est avéré suffisante pour augmenter le signal de la carbonylation des échantillons de la 2cpA et de la 2cpB sur des gels de

polyacrylamide à 12,5%. Nos résultats montrent ainsi que la 2cpA et la 2cpB d'*A. thaliana* sont sensibles *in vitro* à la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine.

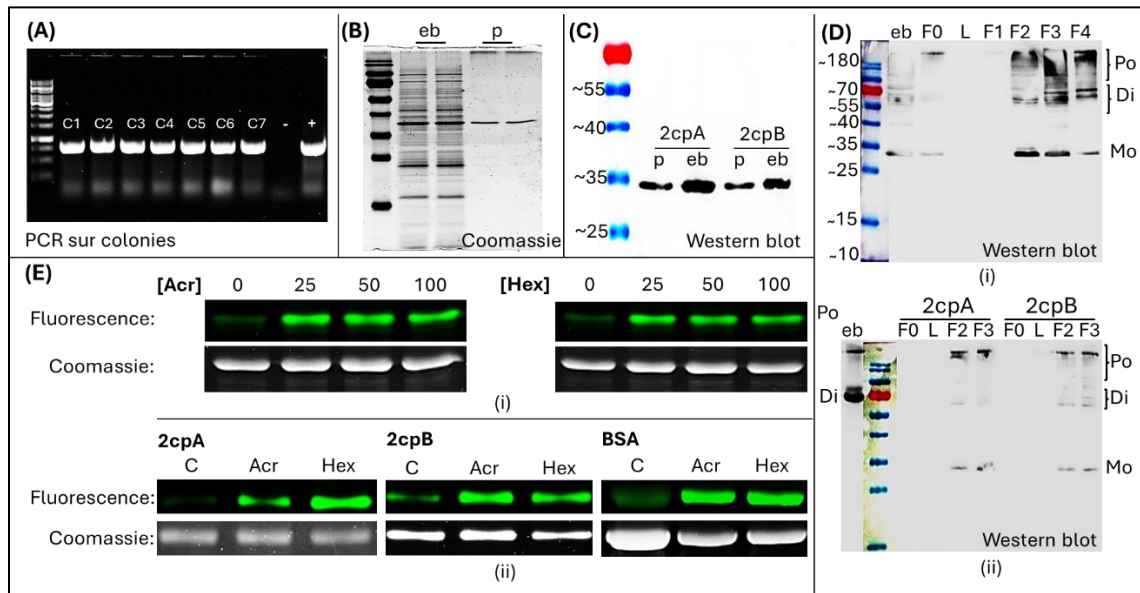


Figure 3.3 : Expression hétérologue et validation de la carbonylation de la 2-CysPrx avec le 2-hexenal et l'acroléine. Les gènes des protéines 2cpA et 2cpB synthétisés à partir de l'ARNm isolé des feuilles d'*A. thaliana* (Col-0) ont été insérés entre les sites de restriction BamHI et XhoI du plasmide d'expression pET28a. (A) Image représentative d'un gel de PCR sur colonies effectué sur la souche *E. coli* BL21 transformée avec le plasmide recombinant pET28a-2CpA/2cpB. Les pistes marquées de c1 à c7 correspondent à 7 colonies testées. Le témoin positif est indiqué par (+) et le témoin négatif par (-). (B) Image représentative d'un gel de protéines recombinantes coloré au bleu de Coomassie. La purification des protéines a été réalisée avec une colonne Ni-NTA. eb : extrait brut ; p : éluat. (C) Exemple typique de membrane de Western blot montrant les protéines dénaturées. Seuls les monomères de 2-CysPrx (~30 kDa) sont observables sur la membrane aussi bien dans les éluats (p) que dans les extraits bruts (eb). (D) Exemples typiques de membrane de Western blot illustrant l'identification des différentes tailles de la 2-CysPrx recombinante avec l'anticorps anti-His-tag. (i) Les échantillons de protéines ont été réduits avec 10 mM de DTT. Les fractions F1-F4 ont été concentrées avec les filtres à centrifuger Amicon Ultra-0,5 mL avant d'être chargées sur le gel. La membrane montre différentes tailles de la 2-CysPrx allant des monomères (~30 kDa) aux agrégats (>180 kDa). eb : extrait brut ; F0 : fraction résiduelle ; L : lavage ; F1-F4 : fractions de 2-CysPrx purifiées (éluats). Mo : monomères ; Di : dimères ; Po : polymères. (ii) l'extrait brut (eb) n'a pas été réduit avec le DTT avant l'analyse. On y distingue uniquement des dimères (~60 kDa) et des agrégats de 2-CysPrx (> 180 kDa). Les fractions réduites F2-F3 pour la 2cpA et la 2cpB montre différentes tailles de 2-CysPrx allant des monomères aux agrégats. (E) Exemples typiques de gels de 2cpA, 2cpB et de BSA (sérum albumine bovine) carbonylés avec le 2-hexenal et l'acroléine. En vert (fluorescence) : protéines carbonylées ; en gris (Coomassie)

: protéines totales. Les protéines carbonylées ont été marquées à l'obscurité avec la sonde Cy7.5-Hz (62,5 pmol/ μ L). Le témoin, protéine non traitée, est indiqué par « C », la protéine carbonylée par l'acroléine par « Acr » et celle carbonylée par le 2-hexenal par « Hex ». Le BSA a été employé comme contrôle pour valider la carbonylation des protéines recombinantes. Le BSA compte 111 sites potentiels de carbonylation par les RCS, parmi lesquelles 34 cystéines. À l'aide d'un test de gradient de concentration du 2-hexenal et de l'acroléine (0-100 μ M) (i), nous avons choisi 50 μ M comme étant la concentration optimale pour les essais de carbonylation des protéines recombinantes (ii).

3.6.3. Les thiols de la 2-CysPrx sont des cibles *in vitro* du 2-hexenal et de l'acroléine

La 2-CysPrx d'*A. thaliana* est caractérisée par deux cystéines conservées qui sont responsables de son activité enzymatique. Au cours de la réaction avec le H₂O₂, le résidu Cys119 (-SH) subit une oxydation pour former un sulfényle (-SOH) (**Figure 3.4A**). Par la suite, le résidu Cys241 (-SH) du monomère partenaire se lie au résidu Cys119 sulfénylé pour former un pont disulfure interchaîne (S-S). En effet, la 2-CysPrx d'*A. thaliana* est une 2-CysPrx typique ; les 2-CysPrx atypiques formant des ponts disulfures intrachaînes. La thiorédoxine (Trx) intervient pour rompre le pont disulfure formé entre les deux résidus Cys, permettant ainsi de les régénérer à leur état initial (-SH). En cas d'hydroxydation de la Cys119 sulfénylée (sulfinylation, -SO₂H), la réaction de polymérisation est déclenchée, conduisant à la formation de molécules de haut poids moléculaire pouvant exécuter une activité chaperonne. Nos analyses *in silico* ont montré que les résidus Cys119 et Cys241 sont des sites potentiels de la carbonylation de la 2cpA par le 2-hexenal et l'acroléine. Selon le mécanisme de la réaction d'addition de Michael, la carbonylation de la cystéine par le 2-hexenal et l'acroléine entraînerait la formation du cystéinyl-hexanal et du cystéinyl-propanal, respectivement (**Figure 3.4B-i, iv**). Pour déterminer expérimentalement que le 2-hexenal et l'acroléine se lient aux résidus Cys de la 2cpA et de la 2cpB, nous avons utilisé le réactif d'Ellman ou DTNB [acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)]. Ce réactif se lie aux groupements thiols libres en solution pour former le TNB [(2-nitro-5-thiobenzoate)] de couleur jaune qui absorbe à 412 nm. Ainsi, pour examiner la diminution des groupements thiols libres résultant de leur carbonylation, les échantillons de protéines ont été réduits pendant 1 h à 4 °C avec 10 mM de DTT (**Figure 3.4C**), puis traités pendant 1 h à 4 °C avec le 2-hexenal et acroléine (0-100 μ M). Le DTT et les aldéhydes non liés ont ensuite été éliminés du milieu par échange de tampon avec du tampon phosphate de sodium

0,1 M (pH 8,0) à l'aide des tubes à centrifuger Amicon Ultra-0.5 mL. Finalement les échantillons ont été incubés avec le DTNB. Le milieu réactionnel à base du tampon phosphate de sodium contenait 1 mM d'EDTA, 0,2 µg/µL d'échantillon de protéine et 70 µg/mL de DTNB. Nos résultats ont montré une diminution significative de la teneur en thiols libres dans les échantillons traités avec le 2-hexenal et l'acroléine, en comparaison aux échantillons non traités de la 2cpA (1,85 ± 0,014 mM éq Cys) et de la 2cpB (2,14 ± 0,031 mM éq Cys), et ceci, quel que soit la concentration de l'aldéhyde utilisé (**Figure 3.4D-i, ii**). Ces résultats montrent ainsi que les résidus Cys de la 2cpA et de la 2cpB sont des cibles du 2-hexenal et de l'acroléine. Cette sensibilité des cystéines aux aldéhydes peut avoir un impact significatif sur la structure et l'activité de la 2cpA et de la 2cpB.

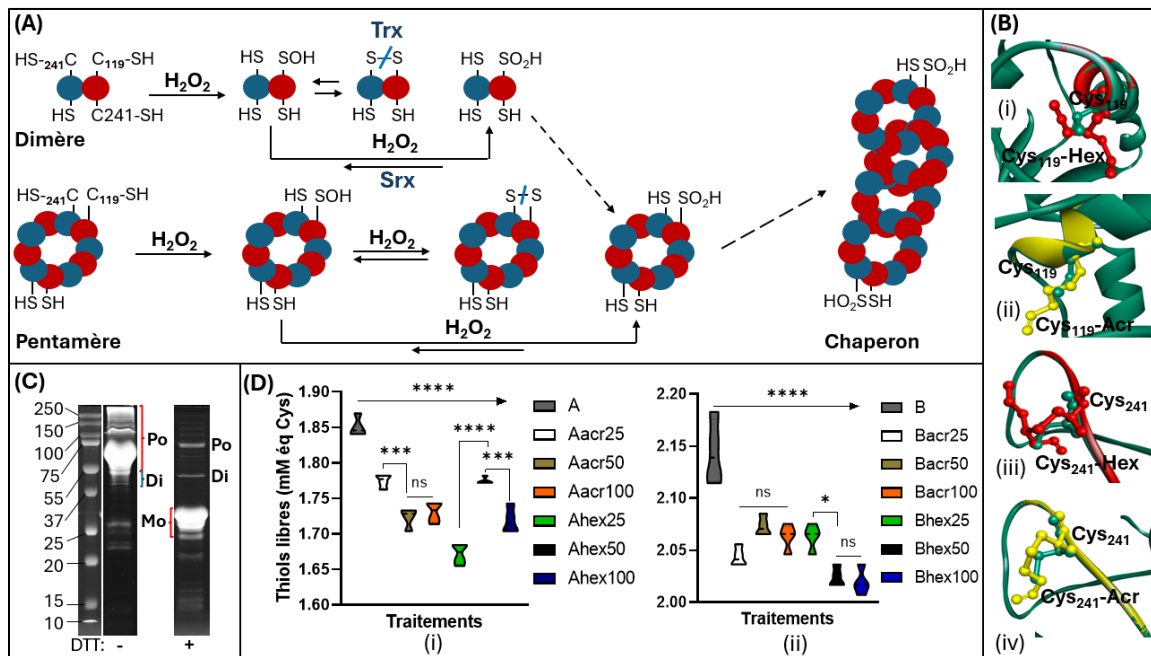


Figure 3. 4 : Les résidus Cys de la 2-CysPrx sont des cibles du 2-hexenal et de l'acroléine. (A) La 2-CysPrx d'*A. thaliana* est connue pour exister essentiellement sous ses formes dimériques et pentamériques, et ces deux structures de base exécutent une activité enzymatique grâce à l'activité de la Cys peroxydatique (Cys119) et de la Cys résolutive (Cys241). Au cours de la réaction avec le H₂O₂, la Cys119 (-SH) forme un sulfényle (-SOH). La Cys241 du monomère adjacent se lie à la Cys119 sulfénylée pour former un pont disulfure interchaîne. La thiorédoxine (Trx) vient réduire le pont disulfure pour régénérer les deux cystéines dans leur état initial (-SH). Dans le cas où la Cys119 sulfénylée attaque un second H₂O₂, elle subit une hyperoxydation pour former un sulfinyle (-SO₂H), ce qui engage la protéine dans le mécanisme de polymérisation si l'activité régulatrice de la sulfirédoxine (Srx) est lente. La polymérisation conduit à la formation des molécules de

haut poids moléculaire pouvant exécuter une activité chaperonne. (B) La carbonylation des résidus Cys119 et Cys241 par le 2-hexenal et l'acroléine forment dans la structure de la 2-CysPrx des cystéinyl-hexanal (i, iii) et des cystéinyl-propanal (ii, iv), respectivement. En vert : protéines non carbonylées. En rouge : protéines dont l'un des résidus Cys a été modifié avec le 2-hexenal. En jaune : protéines dont l'un des résidus Cys a été modifié avec l'acroléine. Les structures carbonylées des résidus Cys ont été générées avec DSV et optimisées avec la force de champ rapide de type Dreiding. (C) Image représentative de gels montrant la réduction de la 2-CysPrx par le DTT. Po : polymères ; Di : dimères ; Mo : monomères. (D) L'analyse *in vitro* avec le réactif d'Ellman montre que la carbonylation de la 2cpA et de la 2cpB avec le 2-hexenal (Hex, 25-100 μ M) et l'acroléine (Acr, 25-100 μ M) entraîne une diminution de la quantité de thiols libres. Les ratio protéines/aldéhydes (μ M/ μ M) étaient : 8,5 :0 ; 8,5 :25 ; 8,5 :50 ; 8,5 :100, respectivement. Les astérisques dénotent des différences significatives, test post hoc de Tukey, ANOVA à un facteur. * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$; ns : non significatif.

3.6.4. La carbonylation affecte *in silico* la stabilité de la 2-CysPrx

3.6.4.1. Simulation moléculaire dynamique avec le monomère

Pour examiner *in silico* l'impact de la carbonylation sur la stabilité du monomère de la 2cpA (5ZTE), nous avons additionné le 2-hexenal et l'acroléine sur les résidus Cys119, His208 et Cys241. Nous avons ensuite examiné la simulation MD de la protéine native et des protéines carbonylées grâce au programme GROMACS. Nos résultats indiquent que le RMSD de la protéine native et celui de la protéine carbonylée avec l'acroléine sur son résidu Cys119 (C119-Acr) restent inférieurs à 1,5 Å durant toute la durée de la simulation MD (**Figure 3.5A-i**). Cela suggère que ces deux protéines conservent une bonne stabilité structurale pendant la simulation MD. En comparaison, les protéines modifiées par le 2-hexenal sur les résidus Cys119 et His208 (C119-Hex et His208-Hex, respectivement) présentent une plus grande instabilité pendant la simulation MD. Ceci est traduit par une augmentation progressive de leurs RMSD au cours du temps (**Figure 3.5A-i**). De plus, nos résultats montrent que la carbonylation augmente significativement le RMSD moyen de la protéine, indiquant ainsi une plus grande flexibilité des protéines carbonylées (1,02 à 1,85 Å) par rapport à la protéine native ($0,91 \pm 0,13$ Å) (**Tableau 3.3**). En particulier, les protéines carbonylées avec le 2-hexenal présentent des valeurs moyennes de RMSD plus élevées (1,19 à 1,85 Å) par rapport à celles des protéines carbonylées avec l'acroléine (1,02 à 1,33 Å) (**Tableau 3.3**).

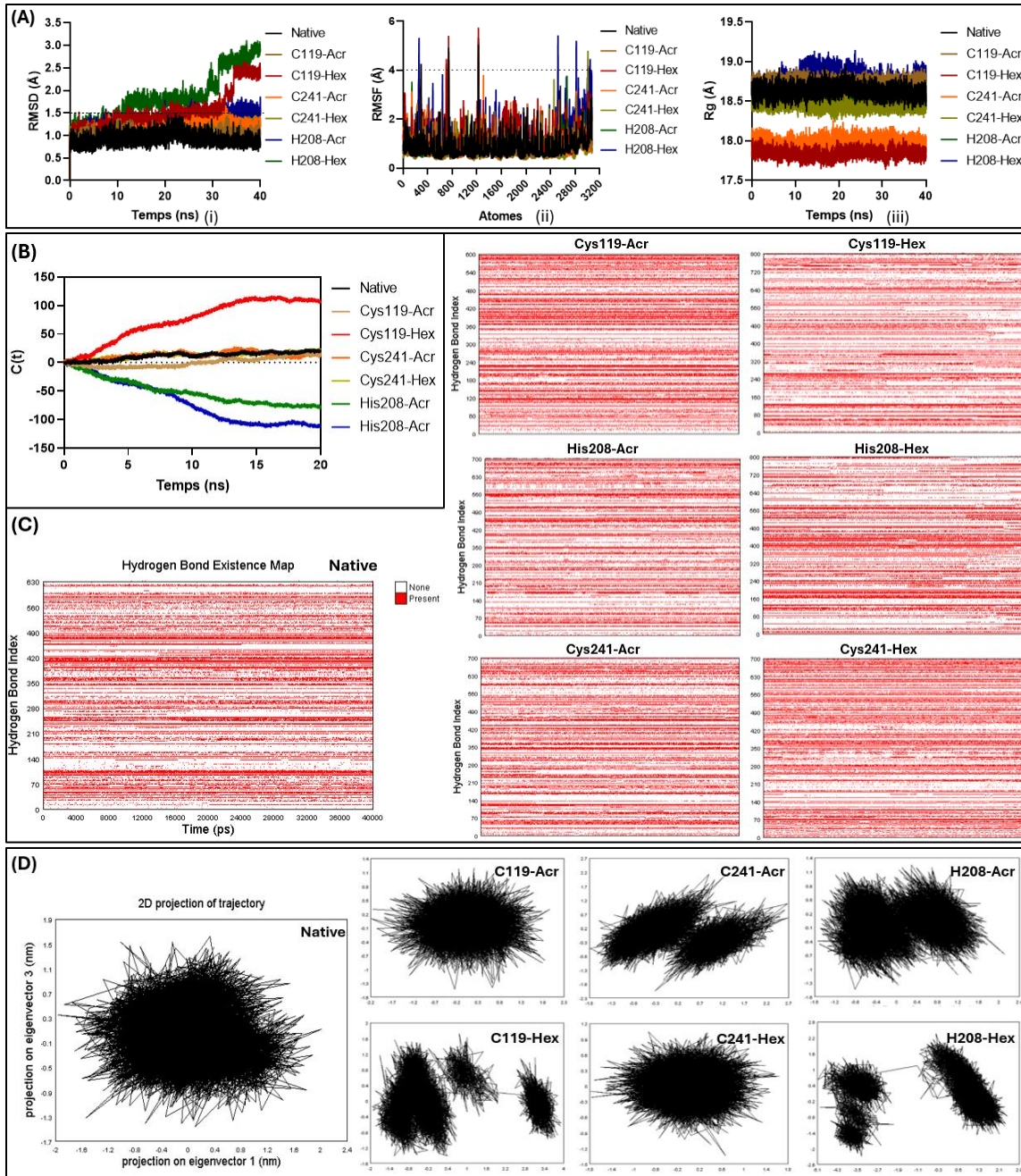


Figure 3. 5 : La carbonylation affecte *in silico* la stabilité structurale du monomère de la 2cpA. Les formes carbonylées de la protéine ont été générées avec le logiciel DSV en additionnant le 2-hexenal et l'acroléine sur les résidus Cys119, Cys241 et His208. Les résidus carbonylés ont été optimisés avec le champ de force rapide de type Dreiding. La simulation MD de la protéine native et des protéines carbonylées a été examinée pendant 40 ns via le programme GROMACS. Les trajectoires de la simulation MD des protéines carbonylées et de la protéine native ont été analysées via l'écart quadratique moyen (RMSD : mesure de la déviation structurale globale, ce qui renseigne sur la stabilité de la protéine) (A-i), les fluctuations quadratiques moyennes (RMSF : quantifie la flexibilité

locale de chaque atome) (A-ii) et le rayon de giration (Rg : mesure de la taille de la protéine) (A-iii), et en examinant la formation et la dislocation des liaisons hydrogènes (B-C), ainsi que la projection 2D de la trajectoire des protéines au cours du temps (D). L'ensemble des résultats montrent que la carbonylation du monomère de la 2-CysPrx avec le 2-hexenal et l'acroléine sur les résidus Cys119, Cys241 et His208 modifie sa conformation native (on observe des changements de toutes les métriques de dynamique moléculaire analysés). Le code à une lettre de l'acide aminé suivi du symbole -Hex ou -Acr désigne sa carbonylation avec le 2-hexenal ou l'acroléine, respectivement.

Tableau 3. 3 : Récapitulatif des paramètres clés de la simulation moléculaire dynamique.

	RMSD (Å)	RMSF (Å)	Rg (Å)
Native	0,91 ± 0,13 f	0,90 ± 0,50 d	18,63 ± 0,07 c
Cys119-Acr	1,02 ± 0,08 e	0,83 ± 0,44 e	18,73 ± 0,06 b
Cys119-Hex	1,55 ± 0,40 b	1,17 ± 0,60 b	17,84 ± 0,05 g
His208-Acr	1,33 ± 0,16 c	0,90 ± 0,51 d	18,53 ± 0,07 d
His208-Hex	1,85 ± 0,54 a	1,33 ± 0,75 a	18,78 ± 0,11 a
Cys241-Acr	1,19 ± 0,14 d	0,96 ± 0,50 c	17,99 ± 0,06 f
Cys241-Hex	1,19 ± 0,09 d	0,82 ± 0,49 e	18,44 ± 0,05 e

RMSD : écart quadratique moyen ; RMSF : fluctuation quadratique moyenne ; Rg : rayon de giration. Le code à une lettre de l'acide aminé suivi du symbole -Hex ou -Acr désigne sa carbonylation avec le 2-hexenal ou l'acroléine, respectivement. Les valeurs indiquées par des lettres différentes au sein d'une colonne diffèrent significativement à $p < 0,05$, ANOVA à un facteur, test post hoc de Tukey.

Les variations de RMSD observées entre la protéine native et les protéines carbonylées sont corroborées par l'analyse du RMSF (i.e. la fluctuation moyenne de chaque résidu dans la protéine). En effet, nos résultats montrent des oscillations supérieures à 4 Å pour plusieurs atomes des résidus des protéines carbonylées avec le 2-hexenal (C119-Hex, His208-Hex et Cys241-Hex) (**Figure 3.5A-ii**). L'analyse du RMSF moyen des résidus sur la durée totale de la simulation MD (i.e. pendant 40 ns) révèle également que la carbonylation de la protéine avec le 2-hexenal (0,82 à 1,33 Å) et l'acroléine (0,83 à 0,96 Å) module le mouvement des atomes, en comparaison à la protéine native (0,9 ± 0,5 Å) (**Tableau 3.3**).

Concernant le rayon de giration (Rg) qui correspond à la distribution des distances atomiques par rapport au centre de gravité de la protéine — donnant ainsi une indication sur sa taille et sa compaction — nos résultats montrent que les protéines carbonylées avec le 2-hexenal ou l'acroléine sur les résidus Cys119 et Cys241 (C119-Hex et Cys241-Acr, respectivement), présentent des valeurs de Rg inférieures à celle de la protéine native durant l'ensemble de la simulation MD (i.e. pendant 40 ns) (**Figure 3.5A-iii**). Ainsi, nos

résultats traduisent que ces deux formes de carbonylation entraînent la compaction de la protéine (i.e. son repliement plus prononcé). Toutefois, en comparant le Rg moyen sur la durée totale de la simulation MD (i.e. pendant 40 ns), nos résultats montrent que la carbonylation avec le 2-hexenal sur le résidu His208 (H208-Hex, $R_g = 18,78 \pm 0,11 \text{ \AA}$) et avec l'acroléine sur le résidu Cys119 (C119-Acr, $R_g = 18,73 \pm 0,06 \text{ \AA}$) entraînent un relâchement significatif de la protéine (i.e. une augmentation du Rg), en comparaison à la protéine native ($R_g = 18,63 \pm 0,07 \text{ \AA}$) (**Tableau 3.3**). Les autres formes de modifications entraînent cependant une compaction de la protéine (i.e. une diminution du Rg ; 17,84 à 18,53 Å) (**Tableau 3.3**). Ces résultats montrent ainsi que la carbonylation de la 2-CysPrx avec le 2-hexenal et l'acroléine module sa taille et sa forme générale. Par ailleurs, l'analyse du graphe d'autocorrélation des liaisons hydrogènes, ainsi que de la carte d'existence de ces dernières montrent qu'elles se forment et se rompent différemment entre les protéines carbonylées entre-elles d'une part, et entre les protéines carbonylées et la protéine native d'autre part (**Figure 3.5B-C**). L'existence de cartographies différentes des liaisons hydrogènes entre les formes carbonylées et la forme native confirment ainsi que la carbonylation module la stabilité structurale de la 2-CysPrx.

Finalement, l'analyse de la projection 2D de la trajectoire des protéines montre que l'addition du 2-hexenal et de l'acroléine sur les résidus Cys119, His208 et Cys241 impacte significativement les mouvements de la 2-CysPrx (**Figure 3.5D**). Alors que la forme native et les formes carbonylées C119-Acr et C241-Hex montrent une projection unique dans l'espace (i.e. un seul mode de mouvement significatif), mais avec des coordonnées différentes sur les axes, les formes carbonylées C119-Hex, C241-Acr, H208-Acr et H208-Hex présentent 2 ou 3 projections dans l'espace avec également des coordonnées différentes. Ces résultats d'analyses *in silico* montrent que la carbonylation avec les aldéhydes α,β -insaturés modifierait l'état conformationnel natif de la 2-CysPrx.

3.6.4.2. Simulation moléculaire dynamique avec le dimère

Pour examiner *in silico* l'impact de la carbonylation sur la stabilité du dimère de la 2cpA, nous avons additionné le 2-hexenal et l'acroléine sur les résidus Cys119 des deux monomères partenaires conformément aux résultats obtenus lors de l'amarrage

moléculaire. Nous avons ensuite examiné la simulation MD de la protéine native et des protéines carbonylées à l'aide du programme GROMACS, et nous avons finalement analysés la trajectoire de la simulation MD en se concentrant sur le RMSD, le RMSF et le Rg. Nos résultats montrent que les RMSD des protéines carbonylées restent inférieurs à celui de la protéine native sur toute la durée de la simulation MD, traduisant ainsi une meilleure stabilité structurale des formes carbonylées par rapport à la forme native (**Figure 3.6A-i**). Le RMSD moyen calculé sur la durée totale de la simulation MD est de 3,66 Å pour la protéine native, 3,52 Å pour la protéine carbonylée avec le 2-hexenal et 2,06 Å pour la protéine carbonylée avec l'acroléine (**Tableau 3.4**). Ces valeurs élevées du RMSD avec le dimère sont confirmées par l'analyse du RMSF. En effet, plusieurs atomes des résidus des trois protéines présentent des RMSF supérieurs à 4 Å (**Figure 3.6A-ii**), ce qui traduit une grande liberté de mouvement de ces derniers. La valeur moyenne calculée du RMSF de tous les atomes sur la durée totale de la simulation MD est de 1,1 Å pour la protéine native et la protéine carbonylée avec le 2-hexenal, et 0,94 Å pour la protéine carbonylée avec l'acroléine (**Tableau 3.4**).

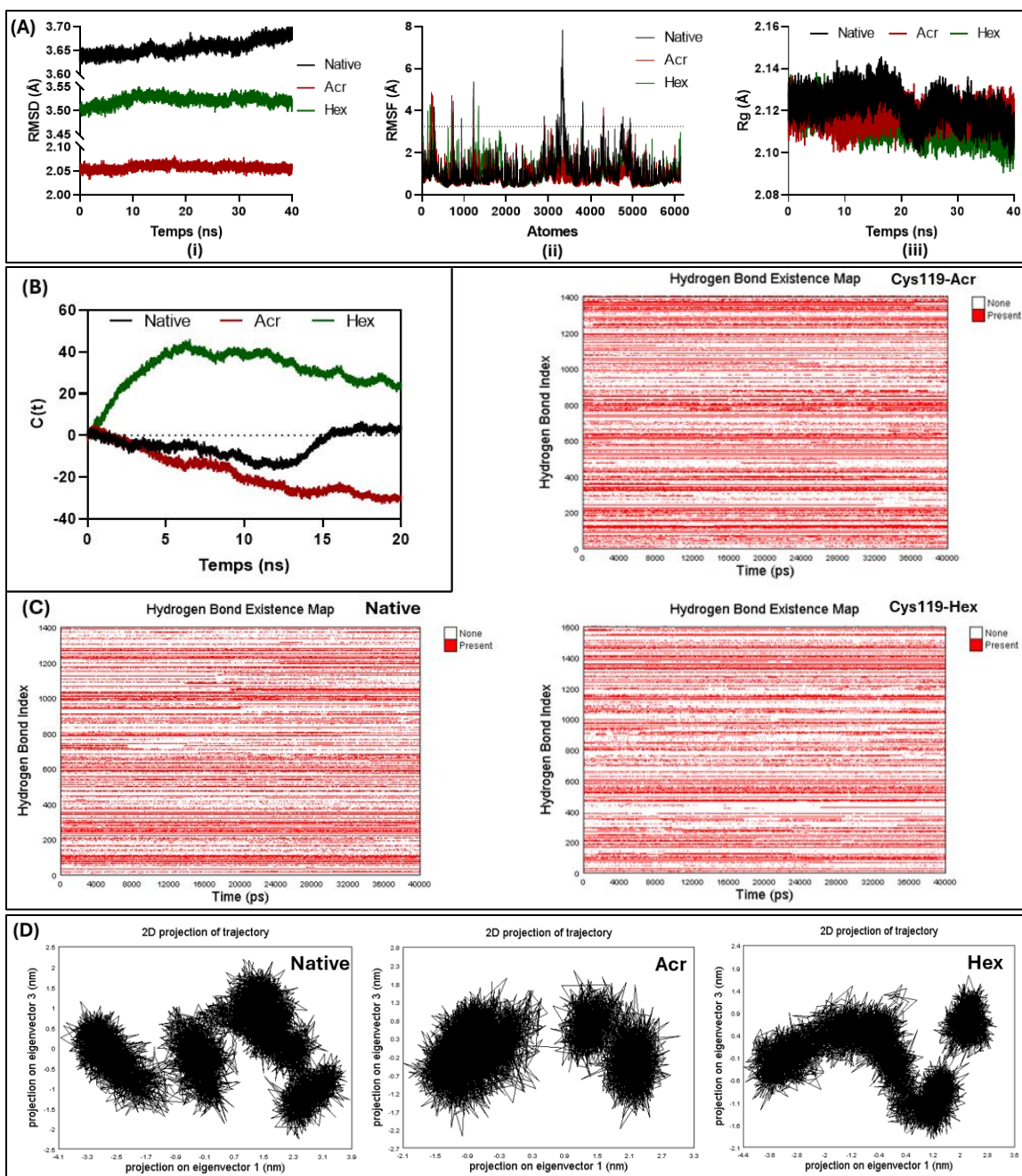


Figure 3. 6 : La carbonylation affecte *in silico* la stabilité structurale du dimère de la 2cpA. Les formes carbonylées de la protéine ont été générées avec le logiciel DSV en additionnant le 2-hexenal et l'acroléine sur les résidus Cys119 des deux monomères partenaires. Les résidus carbonylés ont été optimisés avec le champ de force rapide de type Dreiding. La simulation MD de la protéine native et des protéines carbonylées a été examinée via le programme GROMACS exécuté sur Windows à l'aide du logiciel « MyPresto Portal ». Les simulations MD ont été réalisées pendant 40 ns en utilisant la méthode « autodynamique ». Les trajectoires de la simulation MD des protéines carbonylées et de la protéine native ont été analysées via le RMSD (A-i), le RMSF (A-ii) et le rayon de

giration, Rg (A-iii), et en examinant la formation et la dislocation des liaisons hydrogènes (B-C), ainsi que la projection 2D de la trajectoire des protéines (D). Les symboles Hex et Acr désignent la carbonylation de la 2cpA avec le 2-hexenal et l'acroléine, respectivement. L'ensemble des résultats montrent que la carbonylation des résidus Cys119 du dimère de la 2cpA avec le 2-hexenal et l'acroléine provoque des changements de sa conformation native (on observe des changements de toutes les métriques de dynamique moléculaire analysés).

Tableau 3. 4 : Récapitulatif des paramètres clés de la simulation moléculaire dynamique avec le dimère de la 2cpA.

	Native	Cys119-Acr	Cys119-Hex
RMSD (Å)	3,66 ± 0,02a	2,06 ± 0,01c	3,52 ± 0,01b
RMSF (Å)	1,10 ± 0,75a	0,94 ± 0,56b	1,10 ± 0,60a
Rg (Å)	2,12 ± 0,01a	2,11 ± 0,01a	2,11 ± 0,01a

RMSD : écart quadratique moyen ; RMSF : fluctuation quadratique moyenne ; Rg : rayon de giration. Le code à une lettre de l'acide aminé suivi du symbole -Hex ou -Acr désigne sa carbonylation avec le 2-hexenal ou l'acroléine, respectivement. Les valeurs indiquées par des lettres différentes au sein d'une colonne diffèrent significativement à $p < 0,05$, ANOVA à un facteur, test post hoc de Tukey.

L'analyse du Rg montre que la carbonylation n'affecte pas significativement la taille et la forme générale du dimère de la 2cpA (**Figure 3.6A-iii**). La valeur moyenne calculée du Rg sur la durée totale de la simulation MD est de 2,1 Å pour les trois protéines (**Tableau 3.4**). Toutefois, le graphe d'autocorrélation des liaisons hydrogènes, ainsi que la carte d'existence de ces dernières montrent qu'elles se forment et se disloquent différemment entre la protéine native et les protéines carbonylées d'une part, et entre les protéines carbonylées entre-elles d'autre part (**Figure 3.6B-C**). Ces résultats montrent ainsi que la carbonylation des deux résidus Cys119 du dimère avec le 2-hexenal et l'acroléine entraîne des changements significatifs dans la structure quaternaire de la 2cpA. Par ailleurs, ces changements sont validés par l'analyse comparée de la trajectoire du dimère natif et des dimères carbonylés (**Figure 3.6D**). Par exemple, tandis que la trajectoire 2D du dimère natif montre quatre groupes distincts qui suggère qu'il explore quatre différentes conformations au cours de la simulation MD, la trajectoire 2D du dimère carbonylé avec l'acroléine ne montre que trois groupes distincts, et par ailleurs, avec des coordonnées différentes des groupes du dimère natif (**Figure 3.6D**). Concernant le dimère carbonylé avec le 2-hexenal, l'analyse de la trajectoire 2D ne permet pas de ressortir clairement le nombre de conformations établis au cours de la simulation MD. Il est possible que ce dimère explore 3 à 4 conformations au cours de la simulation MD, mais avec des

coordonnées différentes de celles du dimère natif et du dimère carbonylé avec l'acroléine (**Figure 3.6D**). Ainsi, ces résultats suggèrent que la carbonylation du dimère de la 2cpA sur ses résidus Cys119 avec le 2-hexenal et l'acroléine provoque des modifications dans sa structure quaternaire.

3.6.5. La spectrofluorimétrie valide des changements de la conformation native de la 2cpA et de la 2cpB carbonylée avec le 2-hexenal et l'acroléine

La 2cpA et la 2cpB d'*A. thaliana* contiennent deux résidus tryptophane (Trp) qui peuvent être utilisés comme sondes de fluorescence intrinsèque pour étudier leur dynamique structurale. La structure cristalline de la 2cpA (PDB : 5ZTE) montre les deux résidus Trp aux positions 154 et 245, respectivement. Le Trp154 est situé dans la partie hydrophobe de la protéine sur l'hélice α -3 et est orienté vers le site catalytique où se trouve la Cys119. En revanche, le Trp245 est localisé sur la boucle dans la région C-terminale à proximité de la Cys241. La **figure 3.7A** montre les deux Trp en CPK (code de couleur de Klüber) et leurs positions relatives par rapport aux résidus Cys119 et Cys241 sur un monomère de la 2cpA (en ruban). La position du Trp154 est idéale pour étudier l'interaction entre la protéine et son substrat ou pour examiner des changements opérés dans la poche catalytique. Quant au Trp245, sa localisation dans la région C-terminale est idéale pour analyser les changements opérés dans la conformation native de la protéine (relâchement ou repliement). Ainsi, afin de valider les résultats de simulation et déterminer si la carbonylation entraîne des modifications dans la conformation native des protéines recombinantes 2cpA et 2cpB, nous avons analysé la fluorescence intrinsèque des résidus Trp à l'aide d'un spectrofluorimètre Cary Eclipse. Les protéines natives et carbonylées ont été diluées à une concentration de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans du PBS (pH 7,4). Les spectres d'émission ont été enregistrés entre 295 et 450 nm, avec une longueur d'onde d'excitation de 280 nm. La largeur de la fente était de 10 nm pour l'excitation et l'émission. Les spectres ont été lissés à l'aide d'un filtre de lissage Savitzky-Golay.

Concernant la 2cpA, nos résultats montrent que la protéine native (émission, $\lambda_{\text{max}} = 342,92$ nm ; fluorescence, $I_{\text{max}} = 650,06$) présente des caractéristiques de fluorescence intrinsèque différentes de celles des protéines carbonylées avec le 2-hexenal ($\lambda_{\text{max}} = 342,92$ nm ; $I_{\text{max}} = 771,3$) et l'acroléine ($\lambda_{\text{max}} = 338,92$ nm ; $I_{\text{max}} = 770,67$), en termes

de longueur d'onde maximale d'émission et/ou d'intensité maximale de fluorescence (**Figure 3.7B-i**). La diminution de la longueur d'onde maximale d'émission de la 2cpA après la carbonylation avec l'acroléine suggère une réduction de l'accessibilité des résidus Trp au solvant (i.e. que les Trp s'enfouissent encore plus profondément dans le noyau hydrophobe de la protéine) ; ce qui caractérise une diminution du rayon hydrodynamique de la protéine (i.e. que la protéine s'est repliée). De même, l'augmentation de l'intensité maximale de la fluorescence de la protéine après la carbonylation avec le 2-hexenal suggère une réduction de l'accessibilité des résidus Trp au solvant ; ce qui caractérise également un repliement de la protéine. Ainsi, nos résultats montrent que la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine affecte la conformation native de la 2cpA.

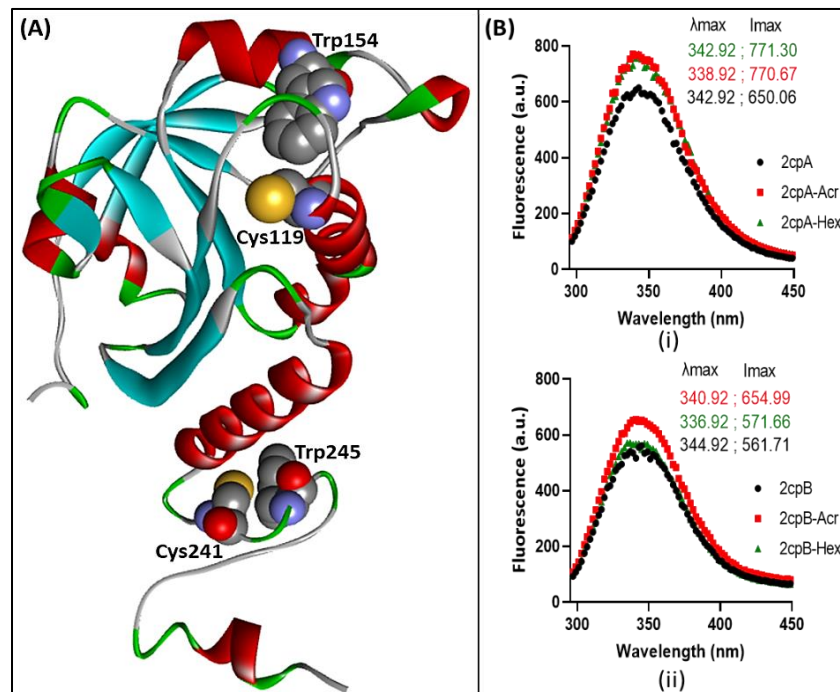


Figure 3. 7 : La carbonylation change la conformation native de la 2-CysPrx. (A) Structure en ruban de la 2cpA montrant les résidus Trp154 et Trp245 en CPK, et leurs positions relatives par rapport aux résidus Cys119 et Cys241 en CPK également. Les Trp sont utilisés comme des sondes de fluorescence intrinsèque pour étudier la dynamique structurale de la protéine. (B) Spectres de fluorescence des résidus Trp de la 2cpA (i) et la 2cpB (ii). Les spectres ont été mesurés entre 295 et 450 nm, avec une excitation à 280 nm, pour des échantillons protéiques à 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans du PBS (pH 7,4). La courbe noire montre le spectre de fluorescence des protéines natives 2cpA et 2cpB, alors que les courbes rouge et verte montrent respectivement les spectres de fluorescence des protéines carbonylées par l'acroléine (2cpA-Acr et 2cpB-Acr) et le 2-hexenal (2cpA-Hex et 2cpB-Hex). Ces données

sont représentatives de trois expériences indépendantes. Sur les spectres, les valeurs séparées par un point-virgule représentent respectivement la longueur d'onde maximale d'émission (λ_{max} , en nm) et l'intensité maximale de la fluorescence (I_{max}) des protéines.

Concernant la 2cpB, nos résultats montrent également que la protéine native ($\lambda_{\text{max}} = 344,92$ nm ; $I_{\text{max}} = 561,71$) présente des caractéristiques de fluorescence intrinsèque différentes de celles des protéines carbonylées avec le 2-hexenal ($\lambda_{\text{max}} = 336,92$ nm ; $I_{\text{max}} = 571,66$) et l'acroléine ($\lambda_{\text{max}} = 340,92$ nm ; $I_{\text{max}} = 654,99$), et ceci, en termes de longueur d'onde maximale d'émission et d'intensité maximale de la fluorescence (**Figure 3.7B-ii**). La carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine entraîne une diminution de la longueur d'onde maximale d'émission des Trp, suggérant ainsi une réduction de leur accessibilité au solvant. Ces observations caractérisent ainsi un enfouissement plus poussé des Trp dans le noyau hydrophobe, traduisant des repliements plus prononcés de la 2cpB après la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine. Ainsi, la carbonylation avec les aldéhydes α,β -insaturés change la conformation native de la 2cpB.

3.6.6. La carbonylation affecte la distribution de la taille de la 2-CysPrx

Pour examiner l'impact de la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine sur la distribution en solution de la taille des particules de la 2cpA et de la 2cpB, nous avons employé la technique de la diffusion dynamique de la lumière ou DLS. Pour cela, les protéines (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ont été réduites ou non avec du DTT (20 mM, 1 h, 4 °C), ensuite carbonylées avec le 2-hexenal et l'acroléine (50 μM , 1 h, 4 °C) et finalement transférées dans du PBS à l'aide des filtres à centrifuger Amicon Ultra-0,5 mL pour les analyses de DLS. La réduction avec le DTT consistait à l'enrichissement des échantillons en monomères. Les expériences de DLS ont été réalisées en utilisant la « méthode automatique de mesure par lots à température constante, 25 °C ». Les résultats ont été interprétés en faisant ressortir pour chaque population de particules sa proportion dans l'échantillon (%M, pourcentage de masse), son pourcentage de dispersion (%Pd) et son rayon hydrodynamique moyen (Rh).

Concernant l'analyse DLS avec les échantillons enrichis en monomères avant la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine, nos résultats montrent que tous les échantillons présentent une distribution monomodale (%M = 100 ; i.e. qu'une seule

population de particules est statistiquement représentée dans l'échantillon) (**Figure 3.8A-B**). Cependant, le %Pd varie d'un échantillon à l'autre. Dans le cas de la 2cpA, nos résultats montrent que contrairement à l'échantillon non carbonylé (2cpA, %Pd = 24,2), les %Pd des échantillons carbonylés avec le 2-hexenal (2cpA-Hex, %Pd = 9,5) et l'acroléine (2cpA-Acr, %Pd = 13,7) sont inférieurs à 15 ; ce qui traduit que les échantillons carbonylés sont statistiquement monodispersés (i.e. homogènes) alors que l'échantillon non carbonylé est polydispersé (i.e. hétérogène) (**Figure 3.8A-i, iii**). Les Rh moyens des particules dans les échantillons carbonylés avec le 2-hexenal (4,49 nm) et l'acroléine (4,65 nm) sont inférieurs à celui des particules dans l'échantillon non carbonylé (4,99 nm) ; traduisant ainsi que la carbonylation réduit le volume des particules de la 2cpA en solution (**Figure 3.8A-i, iii**). Dans le cas de la 2cpB, nos résultats montrent que l'échantillon carbonylé avec l'acroléine est monodispersé (2cpB-Acr, %Pd = 11,2), tandis que l'échantillon non carbonylé (2cpB, %Pd = 24,7) et celui carbonylé avec le 2-hexenal (2cpB-Hex, %Pd = 18,7) sont polydispersés (**Figure 3.8B-i, iii**). Toutefois, l'échantillon carbonylé avec le 2-hexenal est moins hétérogène que l'échantillon non carbonylé. Les Rh moyens des particules dans les échantillons carbonylés avec le 2-hexenal (4,66 nm) et l'acroléine (4,69 nm) sont inférieurs à celui des particules dans l'échantillon non carbonylé (4,84 nm) (**Figure 3.8B-i, iii**). Ainsi, la carbonylation réduit également la taille des particules de la 2cpB en solution. Ces résultats traduisent ainsi que le 2-hexenal et l'acroléine induisent des changements importants de structure et de comportement en solution de la 2cpA et de la 2cpB, tout en réduisant également leur degré d'hétérogénéité (i.e. que les échantillons carbonylés ont moins de formes structurales que l'échantillon natif).

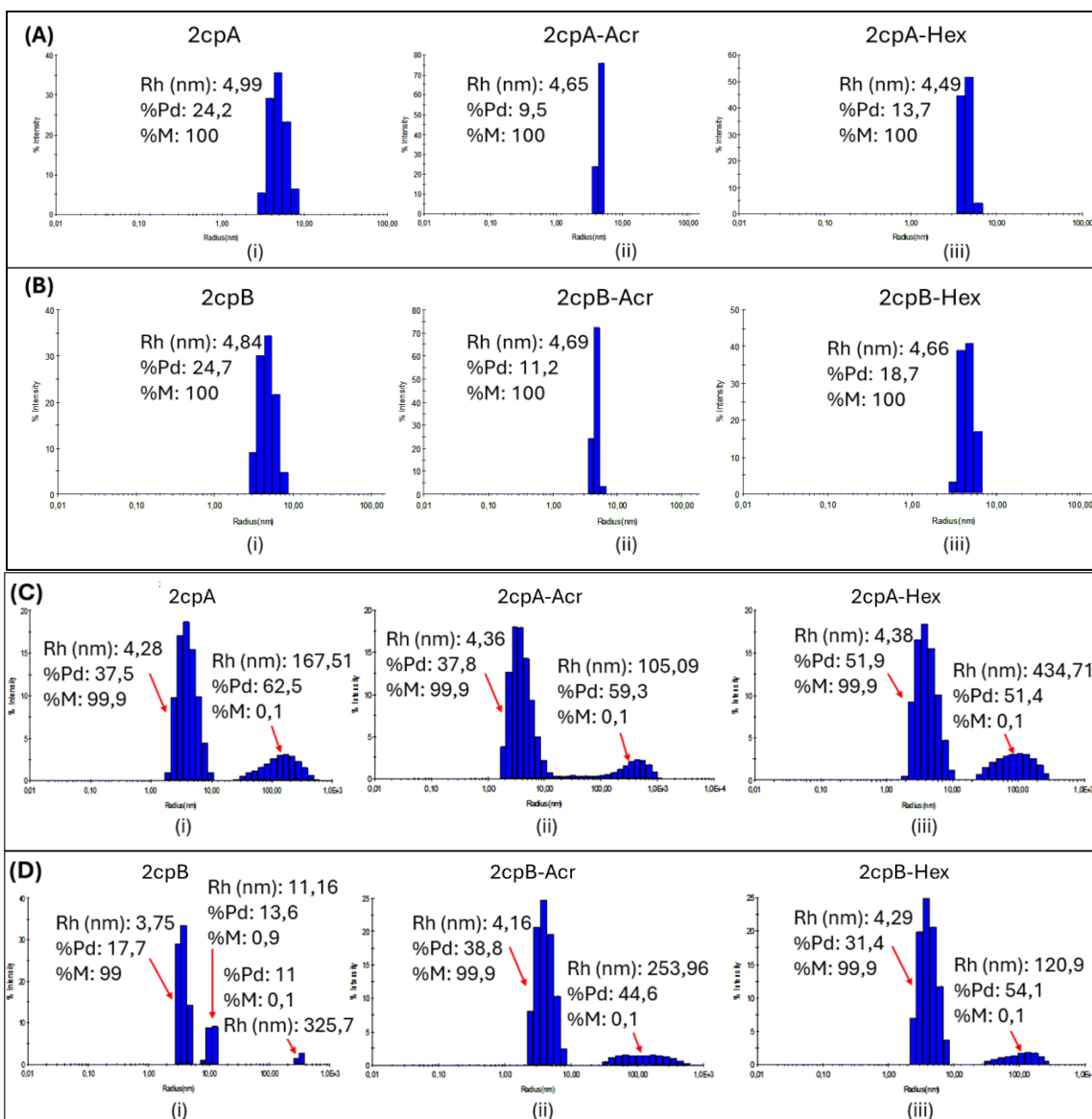


Figure 3. 8 : La carbonylation module la distribution de la taille des particules de la 2cpA et de la 2cpB en solution. Les analyses ont été effectuées à l'aide de la technique de la diffusion dynamique de la lumière à partir des 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ d'échantillons enrichis (A-B) ou non (C-D) en monomères avant la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine. Nous avons fait ressortir pour chaque population de particules protéiques sa proportion dans l'échantillon (%M, pourcentage de masse), son pourcentage de dispersion (%Pd) ainsi que son rayon hydrodynamique moyen (Rh). Pour chaque case de données, (i) représente l'échantillon non carbonylé, (ii) l'échantillon carbonylé avec l'acroléine et (iii) celui carbonylé avec le 2-hexenal. En considérant les échantillons enrichis, nos résultats montrent d'une part que tous les échantillons suivent une distribution monomodale, et d'autre part que le 2-hexenal et l'acroléine réduisent l'hétérogénéité et la taille des particules de la 2cpA et de la 2cpB en solution. Cependant, en considérant les échantillons non enrichis, nos résultats montrent d'une part que tous les échantillons suivent une

distribution polymodale, et d'autre part que l'impact du 2-hexenal et de l'acroléine sur la taille des particules varie d'une population de particules à l'autre entre les échantillons. Ainsi, nos résultats montrent que la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine a un impact significatif sur la structure et le comportement en solution de la 2cpA et de la 2cpB.

Concernant l'analyse DLS avec les échantillons non enrichis en monomères avant la carbonylation (i.e. contenant des oligomères et probablement des agrégats), nos résultats montrent que tous les échantillons présentent une distribution polymodale (i.e. qu'un minimum de deux populations de particules sont statistiquement représentées). Dans le cas de la 2cpA, les échantillons carbonylés avec le 2-hexenal ($Rh_1 = 4,38$; $Rh_2 = 434,71$ nm) et l'acroléine ($Rh_1 = 4,36$; $Rh_2 = 105,09$ nm) suivent, tout comme l'échantillon natif ($Rh_1 = 4,28$; $Rh_2 = 167,51$ nm), une distribution bimodale. Par ailleurs, ces deux populations de particules sont statistiquement très hétérogènes ($\%Pd > 30$), aussi bien dans l'échantillon natif ($\%Pd_1 = 37,5$; $\%Pd_2 = 62,5$) que dans les échantillons carbonylés avec le 2-hexenal ($\%Pd_1 = 51,9$; $\%Pd_2 = 51,4$) et l'acroléine ($\%Pd_1 = 37,8$; $\%Pd_2 = 59,3$) (**Figure 3.8C, i-iii**). Dans le cas de la 2cpB, les échantillons carbonylés avec le 2-hexenal ($Rh_1 = 4,29$; $Rh_2 = 120,9$ nm) et l'acroléine ($Rh_1 = 4,16$; $Rh_2 = 253,96$ nm) suivent une distribution bimodale avec des populations très hétérogènes ($\%Pd > 30$) (2-hexenal : $\%Pd_1 = 31,4$ et $\%Pd_2 = 54,1$; acroléine : $\%Pd_1 = 38,8$ et $\%Pd_2 = 44,6$), tandis que l'échantillon natif suit une distribution trimodale ($Rh_1 = 3,75$; $Rh_2 = 13,6$; $Rh_3 = 325,7$ nm) avec une population hétérogène ($\%Pd > 15$) et deux populations homogènes ($\%Pd < 15$) ($\%Pd_1 = 17,7$; $\%Pd_2 = 13,6$; $\%Pd_3 = 11$) (**Figure 3.8D, i-iii**). Ainsi, ces résultats montrent également que le 2-hexenal et l'acroléine induisent en solution des changements importants sur les structures de base de la 2cpA et de la 2cpB. Il est donc envisageable que le faible nombre de structures observées avec les échantillons carbonylés après enrichissement des monomères traduit plutôt une réduction de la capacité d'oligomérisation des monomères carbonylés.

3.6.7. La carbonylation affecte la capacité d'agrégation de la 2-CysPrx

À la suite des résultats DLS précédents qui ont montré que la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine a un impact significatif sur la structure et le comportement en solution de la 2cpA et de la 2cpB, nous avons induit l'hydroxydation des échantillons carbonylés pour examiner la formation des agrégats (i.e. des complexes de haut poids

moléculaire). Pour ce faire, les échantillons de protéines préalablement traitées avec le 2-hexenal et l'acroléine ont été dilués à 0,2 µg/µL dans du PBS, incubés avec 300 µM de H₂O₂ (1 h, 23 °C, 450 rpm), puis analysés au DLS en utilisant la « méthode automatique de mesure par lots à température constante, 25 °C ».

Concernant la 2cpA, nos résultats montrent que l'hydroxydation de l'échantillon non carbonylé entraîne une distribution trimodale (%M₁ = 66,7 ; %M₂ = 0,7 ; %M₃ = 32,6 %), les trois populations étant polydispersées (%Pd₁ = 26,7 ; %Pd₂ = 23,4 ; %Pd₃ = 76,6) (**Figure 3.9A-i**). Les valeurs élevées des Rh moyens pour les particules des populations P2 (Rh₂ = 342,8 nm) et P3 (Rh₃ = 8642 nm) montrent qu'il s'agit des agrégats moléculaires. Pour l'échantillon de la 2cpA carbonylé avec l'acroléine, nos résultats ne montrent pas de populations d'agrégats statistiquement représentées. Néanmoins, ils traduisent que l'hydroxydation de l'échantillon carbonylé avec l'acroléine conduit à la formation d'un pool hétérogène (%Pd = 30,9) de structures oligomériques (Rh = 19,44 nm) (**Figure 3.9A-ii**). Par ailleurs, ces structures oligomériques sont plus volumineuses et plus dispersées que celles observées dans la population P1 de l'échantillon non carbonylé. Concernant l'échantillon de la 2cpA carbonylé avec le 2-hexenal, nos résultats montrent que la population P2 est constituée d'agrégats polydispersés (Rh₂ = 993,9 nm ; %Pd₂ = 16,7) représentant 4,3% des particules totales dans l'échantillon (**Figure 3.9A-iii**). Toutefois, le Rh moyen des particules de cette population d'agrégats est largement inférieur à celui des particules de la population P3 de l'échantillon non carbonylé. Nos résultats montrent ainsi que la carbonylation affecte en solution le comportement d'agrégation de la 2cpA en réduisant sa capacité ou sa vitesse d'agrégation.

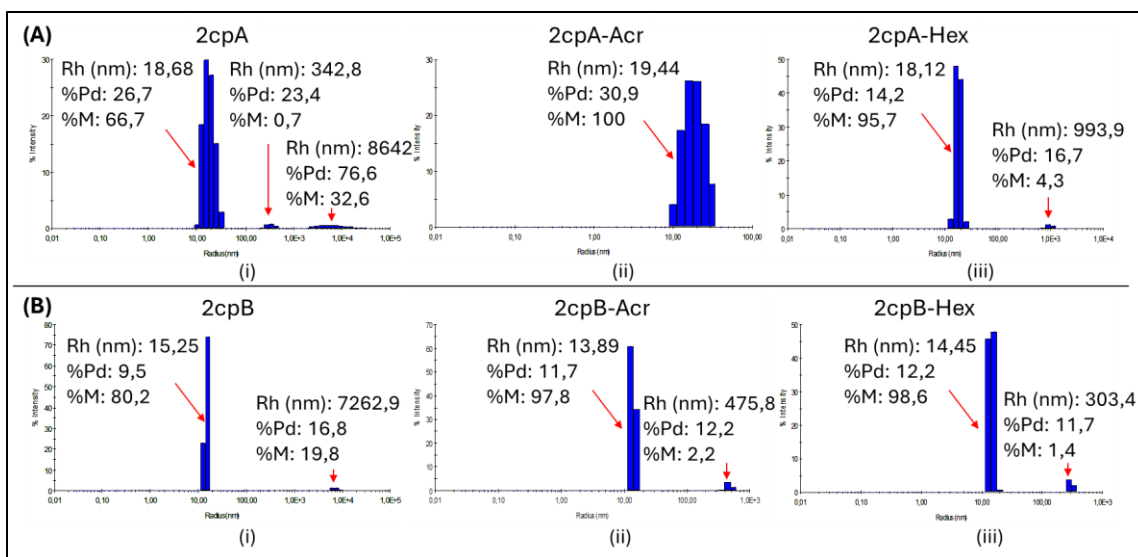


Figure 3. 9 : La carbonylation affecte le comportement d'agrégation de la 2cpA et de la 2cpB. Les protéines carbonylées et non carbonylées ont été diluées à la concentration de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans du PBS (pH 7,4), puis incubées pendant 1 h, à 23 °C, à 450 rpm en présence de 300 μM de H_2O_2 . Les expériences de DLS ont été réalisées en utilisant la « méthode automatique de mesure par lots à température constante, 25 °C ». (A) Résultats de l'analyse des échantillons de la 2cpA non carbonylée (i) et carbonylée avec l'acroléine (ii) et le 2-hexenal (iii). (B) Résultats de l'analyse des échantillons de la 2cpB non carbonylée (i) et carbonylée avec l'acroléine (ii) et le 2-hexenal (iii). Rh : rayon hydrodynamique (en nm), représente la taille des particules ; %Pd : pourcentage de dispersion, mesure le degré d'hétérogénéité d'une population de particule ; %M : pourcentage de masse, représente la proportion d'une population de particule dans un échantillon. Nos résultats montrent que la carbonylation ralentit la vitesse d'agrégation de la 2cpA et de la 2cpB.

Concernant la 2cpB, nos résultats montrent que l'hydroxydation de l'échantillon non carbonylé conduit à la formation d'une population d'agrégats polydispersés (P2 : Rh = 7262,9 nm ; %Pd = 16,8) représentant 19,8% des particules totales dans l'échantillon (**Figure 3.9B-i**). Cependant, les échantillons carbonylés avec le 2-hexenal (P2 : Rh = 475,8 ; %Pd = 12,2) et l'acroléine (P2 : Rh = 303,4 nm ; %Pd = 11,7) présentent des agrégats monodispersés avec des Rh moyens largement inférieurs à celui des agrégats de l'échantillon non carbonylé (**Figure 3.9B-ii, iii**). Par ailleurs, l'hydroxydation de tous les échantillons de la 2cpB conduit également à la formation de structures oligomériques monodispersés, mais dont la taille est plus petite après la carbonylation avec le 2-hexenal (P1 : Rh = 14,45 nm) et l'acroléine (P1 : Rh = 13,89 nm), en comparaison avec l'échantillon non carbonylé (P1 : Rh = 15,25 nm). Ces résultats montrent également que la

carbonylation affecte en solution le comportement d'agrégation de la 2cpB en réduisant sa capacité ou sa vitesse d'agrégation. Ainsi, nos résultats montrent que le 2-hexenal et l'acroléine peuvent entraver significativement la formation de molécules chaperonnes de 2cpA et de 2cpB dans un contexte de stress oxydatif.

3.6.8. La carbonylation n'entraîne pas la formation d'amyloïdes de la 2-CysPrx

Nos analyses DLS ont montré que la carbonylation a un impact significatif sur la structure et le comportement en solution de la 2cpA et de la 2cpB, avec comme conséquence une modulation de leur taille et de leur capacité d'oligomérisation. Ainsi, pour déterminer que la faible proportion d'agrégats, y compris leur faible Rh, observé au DLS dans les échantillons carbonylés avec le 2-hexenal et l'acroléine n'est pas la conséquence d'un repliement conduisant à des structures secondaires majoritairement constituées de feuillets béta plissés, responsables de l'insolubilité et de leur dépôt sous forme de fibrilles, nous avons employé le rouge Congo ou RC. Il s'agit d'un colorant organique qui possède un spectre d'absorption caractéristique, avec un pic d'absorption principal compris entre 490-500 nm. Le RC est capable de se lier aux feuillets béta plissés des protéines mal repliées, ce qui entraîne un déplacement de son spectre d'absorption, avec un pic d'absorption maximal observé aux alentours de 540 nm. Ainsi, nous avons incubé pendant 48 h les échantillons hyperoxydés avec le RC (proportion 2:1, v/v) et nous avons ensuite mesuré le spectre d'absorption entre 400-600 nm à l'aide du spectrophotomètre Shimadzu UV-1280. L'analyse des spectres d'absorptions des échantillons de la 2cpA et de la 2cpB traités avec le RC montre qu'ils sont superposables à celui du RC seul, et ceci, en considérant les échantillons ayant subis ou non l'hydroxydation (**Figure 3.10A-B, i-ii**). Ces résultats montrent ainsi que les changements provoqués par le 2-hexenal et l'acroléine sur la structure de la 2cpA et de la 2cpB n'entraînent pas la formation des particules insolubles. Par ailleurs, l'analyse sur gels en condition native des échantillons carbonylés ou non avec le 2-hexenal et l'acroléine montre que tous les échantillons contiennent essentiellement des monomères avant la réaction d'hydroxydation, et des monomères, dimères et agrégats après l'induction de l'hydroxydation (**Figure 3.10C, i-ii**). Ainsi, la présence sur gel d'agrégats dans les échantillons carbonylés avec le 2-hexenal et l'acroléine montre que la carbonylation ne peut qu'affecter la vitesse d'agrégation de la 2cpA et de la 2cpB.

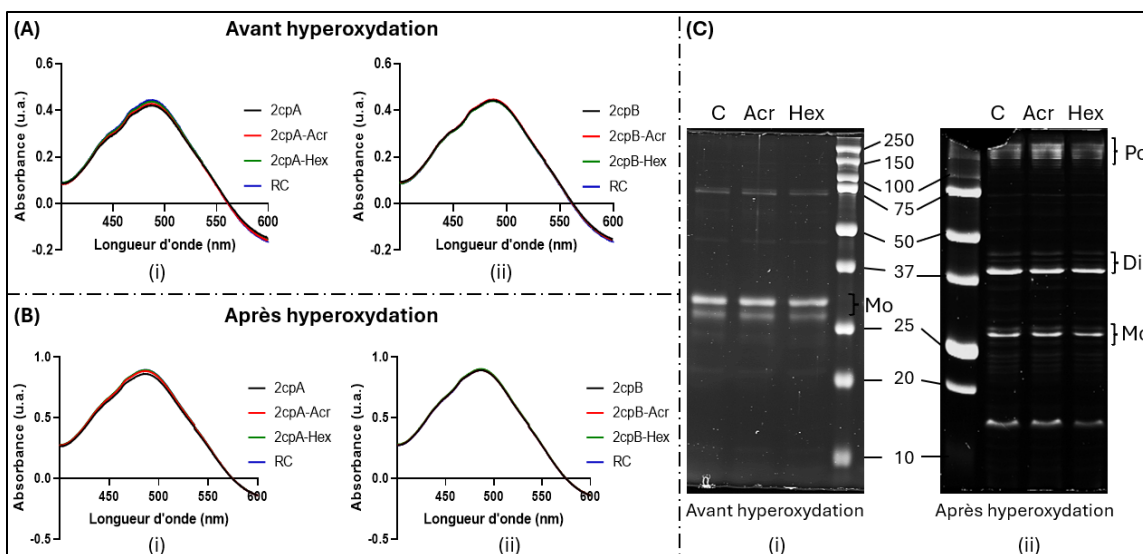


Figure 3. 10 : La carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine n'entraîne pas un mauvais repliement de la 2cpA et de la 2cpB. (A-B) L'analyse des spectres d'absorption des échantillons de la 2cpA (i) et de la 2cpB (ii) traités avec le RC montre que ces derniers sont superposables à celui du RC seul, et ceci, en examinant les échantillons ayant subis ou non l'hyperoxydation. Les échantillons ont été incubés pendant 48 h avec le RC dans les proportions 2:1. Les spectres d'absorption ont été mesuré entre 400-600 nm à l'aide du spectrophotomètre Shimadzu UV-1280. (C) Images représentatives de gels montrant des échantillons de protéines avant l'hyperoxydation (i) et des échantillons de protéines après l'hyperoxydation (ii). Les symboles -Acr et -Hex désignent la carbonylation de l'échantillons avec l'acroléine et le 2-hexenal, respectivement. Mo : monomères ; Di : dimères ; Po : polymères ou agrégats. Nos résultats montrent ainsi que la carbonylation n'entraîne pas l'insolubilité de la 2cpA et de la 2cpB, et n'empêche pas également la formation des agrégats après l'induction de l'hyperoxydation.

3.6.9. La carbonylation affecte la stabilité thermique de la 2-CysPrx

Pour examiner l'impact de la carbonylation sur la stabilité thermique des protéines recombinantes 2cpA et 2cpB, nous avons utilisé la méthode du DLS. Nous avons réutilisé la technique du DLS avec la « méthode automatique de balayage thermique avec un incrément de température de 1 °C ». Le balayage thermique a été effectué entre 20 et 70 °C pour des échantillons de protéines diluées à 0,2 µg/µL dans du PBS. Concernant la 2cpA, nos résultats montrent que la température moyenne de stabilité thermique (T_m) augmente respectivement de 4,7 et de 0,5 °C après la carbonylation avec l'acroléine et le 2-hexenal, en comparaison à l'échantillon non carbonylée ($T_m = 40,6$ °C) (**Tableau 3.5**).

Dans le cas de la 2cpB, cette augmentation est de 2,5 °C après la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine, en comparaison à l'échantillon non carbonylée ($T_m = 40,8$ °C).

Tableau 3. 5 : La carbonylation module la température moyenne de stabilité thermique (T_m) de la 2-CysPrx.

	Carbonylation		Carbonylation + hyperoxydation	
	T_m (°C)	Rh (nm)	T_m (°C)	Rh (nm)
2cpA	40,6	5,4	48,8	24,3
2cpA-Acr	45,3	6,3	50,2	29,2
2cpA-Hex	41,1	4,8	52,5	24,5
2cpB	40,8	4,0	47,9	22,1
2cpB-Acr	43,3	7,7	47,2	18,9
2cpB-Hex	43,3	3,1	54,3	35,8

Nous avons utilisé la technique DLS, en conjonction avec la « méthode automatique de balayage thermique, avec un incrément de température de 1 °C » pour déterminer l'impact de la carbonylation sur la T_m des protéines recombinantes 2cpA et 2cpB. Le balayage thermique a été réalisé de 20 à 70 °C sur 0,2 µg/µL de protéines diluées dans du PBS (pH 7,4). Les résultats montrent que les protéines carbonylées avec le 2-hexenal et l'acroléine présentent une T_m supérieure à celle des protéines non carbonylées, et ceci, pour les échantillons non soumis à la réaction d'hydroxydation. Cependant, après l'induction de la réaction d'hydroxydation, la 2cpB carbonylée avec l'acroléine affiche une T_m inférieure de 0,7 °C à celle de la protéine non carbonylée. T_m : température moyenne ; Rh : rayon hydrodynamique. Les symboles -Hex et -Acr désignent la carbonylation de la protéine avec le 2-hexenal et l'acroléine, respectivement.

Nous avons ensuite induit l'hydroxydation des échantillons pendant 1 h avec 300 µM de H₂O₂, puis nous avons déterminé à nouveau les T_m . Dans le cas de la 2cpA, nos résultats montrent une augmentation respective de la T_m de 1,4 et de 3,7 °C pour les échantillons carbonylés avec l'acroléine et le 2-hexenal, en comparaison à l'échantillon non carbonylé ($T_m = 48,8$ °C) (**Tableau 3.5**). Dans le cas de la 2cpB, nos résultats montrent une diminution de 0,7 °C de la T_m pour l'échantillon carbonylé avec l'acroléine, mais une augmentation de 6,4 °C de la T_m pour l'échantillon carbonylé avec le 2-hexenal, en comparaison à l'échantillon non carbonylé ($T_m = 47,9$ °C) (**Tableau 3.5**). Par ailleurs, nos résultats montrent également que l'hydroxydation augmente la T_m d'un échantillon, en comparaison au même échantillon non soumis à l'hydroxydation (**Figure 3.11A-B**). Par exemple, la T_m de l'échantillon de la 2cpA non carbonylé augmente de 8,2 °C après son hydroxydation, et celui de la 2cpB non carbonylé augmente de 7,9 °C après son hydroxydation. Finalement, nos résultats montrent que le 2-hexenal et l'acroléine module la taille des particules de la 2cpA et de la 2cpB soumises à un stress thermique. Ainsi,

nos résultats montrent que la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine accroît la stabilité thermique des particules de la 2cpA et de la 2cpB en solution.

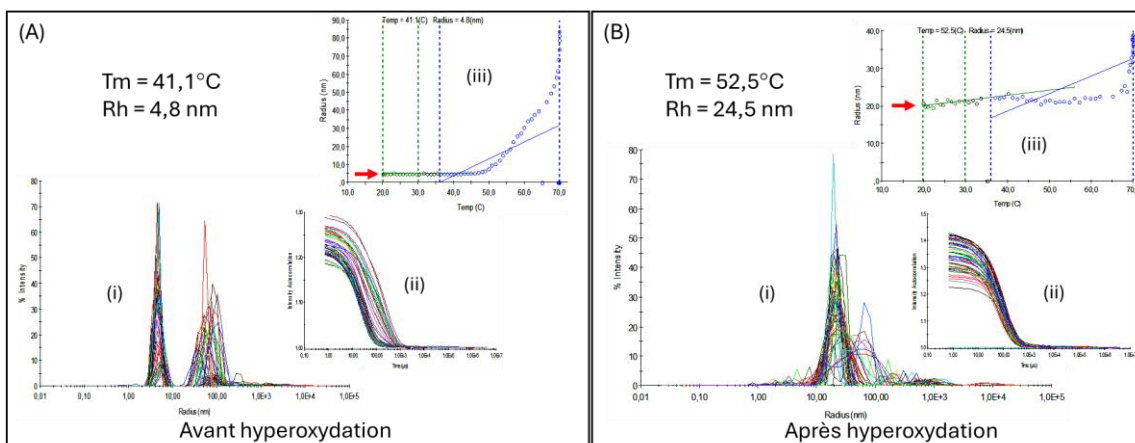


Figure 3. 11 : Exemple de résultats typiques de la détermination par la méthode de DLS de la température moyenne de stabilité thermique (T_m) des échantillons de la 2cpA et de la 2cpB carbonylés ou non avec le 2-hexenal et l'acroléine. Nous avons utilisé la « méthode automatique de balayage thermique, avec un incrément de température de 1 °C ». Le balayage thermique a été effectué entre 20 et 70 °C pour des échantillons de protéines (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) non soumis (A) et soumis à la réaction d'hyperoxydation (B). La T_m a été déterminée à l'aide de la méthode linéaire. (i) Graphique de régularisation, montre la variation de l'intensité du signal en fonction du rayon hydrodynamique (Rh) des particules de l'échantillon ; (ii) graphique de dépendance de la température, montre la variation du Rh des particules en fonction de la température ; (iii) graphique de corrélation, affiche la courbe d'autocorrélation de l'intensité, c'est-à-dire les données brutes de diffusion dynamique de la lumière à partir desquelles les propriétés hydrodynamiques calculées dans DYNAMICS sont dérivées. Les flèches rouges indiquent le Rh initial de l'échantillon.

3.6.10. La carbonylation réduit la capacité enzymatique de la 2-CysPrx

Les résultats précédents ont montré que le 2-hexenal et l'acroléine provoquent des changements structuraux de la 2cpA et de la 2cpB. Ces deux aldéhydes α,β -insaturés sont en effet des électrophiles biologiques qui possèdent la capacité unique de former des liaisons covalentes avec les protéines. Le mécanisme prédominant de la formation de ces liaisons covalentes est l'addition de Michael. Cette réaction implique l'attaque nucléophile des résidus Cys, His, Lys sur le C_β de l'aldéhyde α,β -insaturé, suivie de la protonation du C_α . La **figure 3.12A** montre des structures des adduits simples pouvant se former (addition 1:1 entre l'aldéhyde α,β -insaturé et l'acide aminé) à la suite de la carbonylation des résidus

Cys119 et Cys241 par le 2-hexenal (cystéinyl-hexanal) ou l'acroléine (cystéinyl-propanal), et de l'His208 par le 2-hexenal (histidinyl-hexanal) ou l'acroléine (histidinyl-propanal), conformément aux résultats de nos analyses *in silico*. Les liaisons covalentes sont établies entre le C β de l'aldéhyde α,β -insaturé et le soufre de la cystéine (C β -S), et entre le C β de l'aldéhyde α,β -insaturé et le groupe ϵ -amino du cycle imidazole de l'histidine (C β -N) (**Figure 3.12A**). Pour examiner l'impact de la carbonylation sur l'activité enzymatique de la 2cpA et de la 2cpB, nous avons tout d'abord évalué la sensibilité au H $_2$ O $_2$ des échantillons carbonylés avec le 2-hexenal et l'acroléine en exploitant la fluorescence des résidus Trp. L'acquisition des données a été réalisée pendant 5 min (5 acquisitions au total) après l'ajout de 300 μ M de H $_2$ O $_2$ dans le milieu réactionnel contenant 10 mM de DTT et 0,2 μ g/ μ L de protéines (2cpA/2cpB) préalablement carbonylées pendant 1 h à 4 °C avec 50 μ M de 2-hexenal/acroléine. Nous avons ainsi vérifié que la présence du substrat dans le milieu réactionnel provoque des changements de la conformation structurale des deux protéines, pouvant ainsi traduire qu'elles établissent des interactions avec le H $_2$ O $_2$. L'analyse des spectres obtenus montre qu'après la carbonylation, les deux protéines restent sensibles au H $_2$ O $_2$. On note une diminution de l'intensité de la fluorescence des Trp dès la première minute de contact des échantillons avec le H $_2$ O $_2$ (**Figure 3.12B, i-vi**). Par ailleurs, à l'exception de la 2cpB carbonylée avec l'acroléine (2cpB-Acr), cette baisse de l'intensité de la fluorescence est accompagnée d'un changement de la longueur d'onde maximale d'émission des Trp (**Figure 3.12B, i-vi**). Ces observations suggèrent ainsi que la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine n'empêche pas l'établissement d'interactions entre l'enzyme et son substrat, le H $_2$ O $_2$. Aussi, l'analyse des spectres de la 2cpB-Acr montre que cet échantillon observe un grand délai (\sim 3 min) avant le changement de la première longueur d'onde d'émission des Trp (**Figure 3.12B-v**), ce qui peut suggérer que cet échantillon réagit plus lentement avec le H $_2$ O $_2$.

Après avoir validé que les protéines carbonylées restent sensibles au H $_2$ O $_2$, nous avons examiné l'impact du temps de la réaction de carbonylation sur leur activité enzymatique spécifique. Pour cela, nous avons incubé 0,2 μ g/ μ L de protéine (2cpA/2cpB) avec 50 μ M d'aldéhyde pendant 1-4 h et à 4 °C. Après chaque temps d'incubation, les aldéhydes non liés ont été éliminés du milieu par échange de tampon avec du PBS à l'aide des tubes à centrifuger Amicon Ultra-0.5 mL (seuil de 10 KDa). Ensuite, nous avons

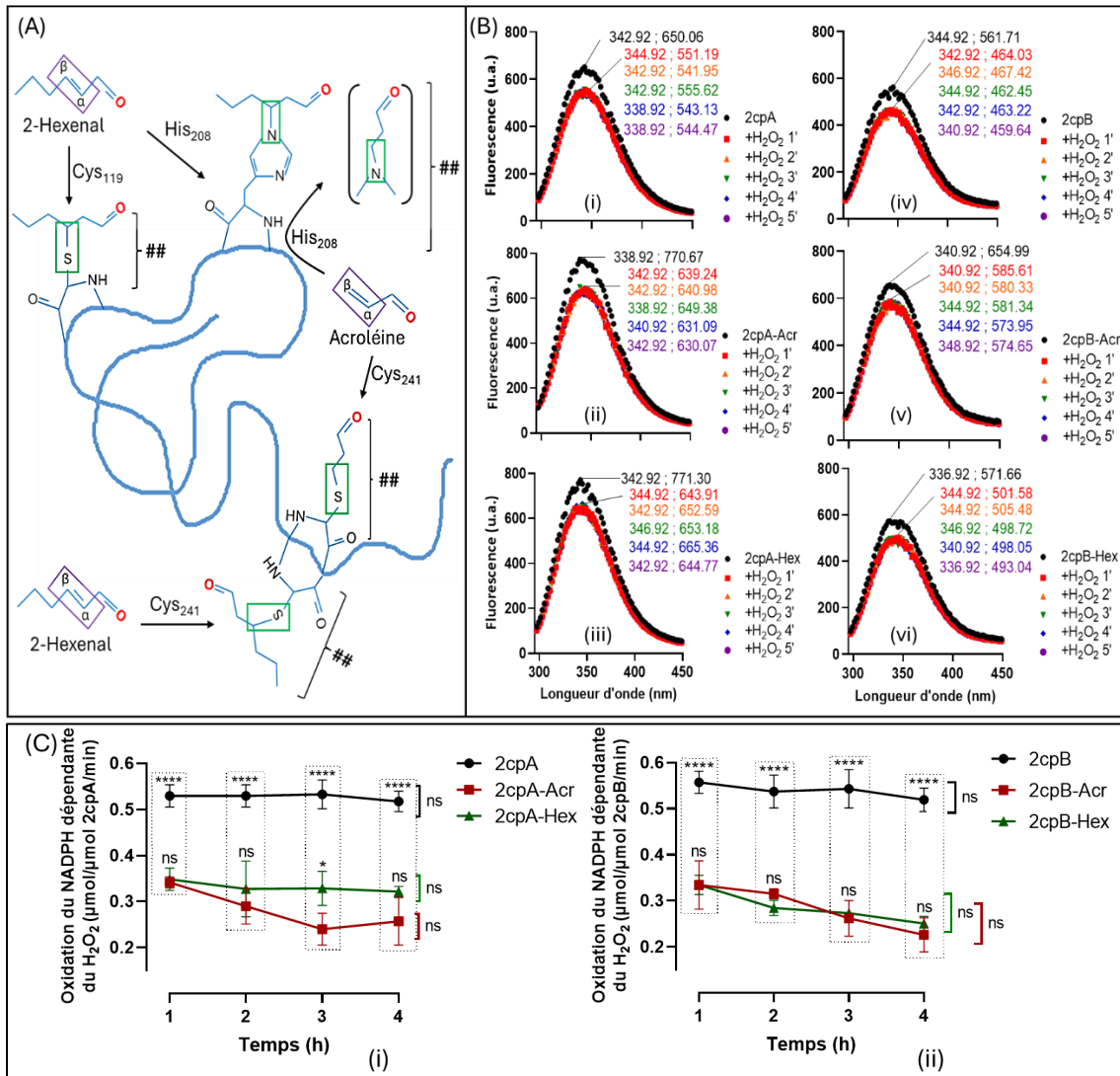
préparé un milieu réactionnel à base de PBS (pH 7,4) contenant 0,2 µg/µL de protéine (2cpA/2cpB), 10 mM d'EDTA, 200 µM de NADPH, 0,25 mM de Trx et 8 µM de TrxR. Après 30 min d'incubation à 30 °C, la réaction enzymatique a été déclenchée par ajout de 300 µM de H₂O₂ dans le milieu. Nos résultats montrent que les échantillons carbonylés exhibent des activités enzymatiques inférieures à celles des échantillons non carbonylés (**Figure 3.12C ; Tableau 3.6-i**). Par ailleurs, ces activités enzymatiques restent stables dans l'intervalle de temps choisi, et ceci, quel que soit l'échantillon considéré (**Figure 3.12C, i-ii ; Tableau 3.6-i**), ce qui suggère que l'impact du 2-hexenal et de l'acroléine sur l'activité enzymatique de la 2cpA et de la 2cpB ne dépend pas du temps de contact entre la protéine et l'aldéhyde, mais des résidus disponibles pour la carbonylation et/ou du ratio molaire aldéhyde/enzyme. Toutefois, comme l'élimination des aldéhydes non liés par ultracentrifugation ne permet pas à la protéine de conserver l'intégralité de son activité enzymatique, cela suggère que la liaison enzyme-aldéhyde doit être irréversible ; ce qui suppose ainsi une inhibition de type covalente.

Nous avons ensuite examiné l'impact de la carbonylation sur la cinétique enzymatique de la 2cpA et de la 2cpB. Pour cela, nous avons utilisé les échantillons de protéines carbonylées pendant 1 h à 4 °C avec 50 µM de 2-hexenal/acroléine, et nous avons déclenché la réaction enzymatique avec une gamme de concentration de H₂O₂ (50-300 µM). Nos résultats montrent que tous les échantillons exhibent une cinétique enzymatique de type Michaelienne (**Figure 3.12D-i, E-i**). Nous avons ensuite déterminé les paramètres cinétiques clés apparents de l'activité enzymatique des échantillons en effectuant une transformation linéaire de l'équation de Michaelis-Menten par la méthode de Lineweaver Burk (**Figure 3.12D-ii, E-ii**). Nos résultats montrent que la carbonylation de la 2cpA et de la 2cpB avec le 2-hexenal et l'acroléine réduit leur vitesse maximale ($V_{max_{app}}$), leur constante de Michaelis-Menten ($K_{m_{app}}$), ainsi que leur constante catalytique ($K_{cat_{app}}$), en comparaison aux échantillons non carbonylés de la 2cpA ($V_{max_{app}} = 0,052 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$; $K_{m_{app}} = 188,1 \mu\text{M}$; $K_{cat_{app}} = 0,28 \text{min}^{-1}$) et de la 2cpB ($V_{max_{app}} = 0,041 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$; $K_{m_{app}} = 105,8 \mu\text{M}$; $K_{cat_{app}} = 0,21 \text{min}^{-1}$) ; ce qui suggère une forme d'inhibition incompétitive (**Figure 3.12D-ii, E-ii ; Tableau 3.6-ii**). Ainsi, nos résultats montrent que la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine n'empêche pas l'interaction entre l'enzyme et le substrat, mais qu'elle ralentit la capacité de l'enzyme à convertir le substrat en produit, et doit

s'effectuer préférentiellement sur un ou plusieurs résidus en dehors du site actif. Par ailleurs, la détermination des constantes d'inhibition apparentes montre que le 2-hexenal (2cpA : $K_{iapp} = 46,3 \mu\text{M}$; 2cpB : $K_{iapp} = 60,24 \mu\text{M}$) a une affinité plus forte pour les deux protéines, en comparaison à l'acroléine (2cpA : $K_{iapp} = 58,14 \mu\text{M}$; 2cpB : $K_{iapp} = 72,5 \mu\text{M}$) (**Tableau 3.6-ii**). Aussi, nos résultats montrent que l'activité enzymatique spécifique des protéines carbonylées avec le 2-hexenal et l'acroléine est très peu accrue avec l'augmentation de la concentration du substrat, tandis que les protéines non carbonylées exhibent une activité enzymatique spécifique qui croit beaucoup avec l'augmentation du substrat (**Tableau 3.6-ii**). Par exemple, avec l'utilisation de 100 et 300 μM de H_2O_2 , l'activité enzymatique spécifique de la 2cpA non carbonylée passe de 0,37 à 0,66 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 2cpA/min (soit une augmentation considérable de 78,4%), tandis que celle de la 2cpA carbonylée avec le 2-hexenal passe de 0,33 à 0,35 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 2cpA/min (soit une augmentation faible de 6,1%) (**Tableau 3.6-ii**). De même, alors que l'activité spécifique de la 2cpB non carbonylée passe de 0,4 à 0,6 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 2cpB/min (soit une augmentation considérable de 50%) avec des concentrations de 100 et 300 μM de H_2O_2 , celle de la 2cpB carbonylée avec le 2-hexenal passe de 0,28 à 0,37 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 2cpB/min (soit une augmentation de seulement 32,14%) (**Tableau 3.6-ii**). Ainsi, cette observation confirme que la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine réduit l'efficacité de la catalyse enzymatique de la 2cpA et de la 2cpB.

Finalement, nous avons examiné l'impact de la concentration du 2-hexenal et de l'acroléine (25-200 μM) sur l'activité enzymatique des protéines. Pour cela, nous avons préparé un milieu réactionnel à base de PBS (pH 7,4) contenant 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protéine (2cpA/2cpB), 10 mM d'EDTA, 200 μM de NADPH, 0,25 mM de Trx et 8 μM de TrxR. Après 30 min d'incubation à 30 °C, nous avons ajouté le 2-hexenal/acroléine dans le milieu réactionnel, puis nous avons incubé le mélange pendant 5 min à 30 °C. La réaction enzymatique a ensuite été déclenchée par ajout de 300 μM de H_2O_2 dans le milieu. Nos résultats montrent que le 2-hexenal et l'acroléine réduisent significativement l'activité enzymatique de la 2cpA ($0,512 \pm 0,01 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 2cpA/min) et de la 2cpB ($0,438 \pm 0,015 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 2cpB/min), et ceci, quel que soit la concentration utilisée (**Tableau 3.6-iii ; Annexe I**). La **Figure 3.12F** montre la diminution de l'activité enzymatique spécifique de la 2cpA et la 2cpB par le 2-hexenal et l'acroléine utilisé à la concentration de 50 μM .

Nos résultats montrent ainsi que la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine affecte la capacité de la 2cpA et de la 2cpB à détoxifier le H₂O₂.



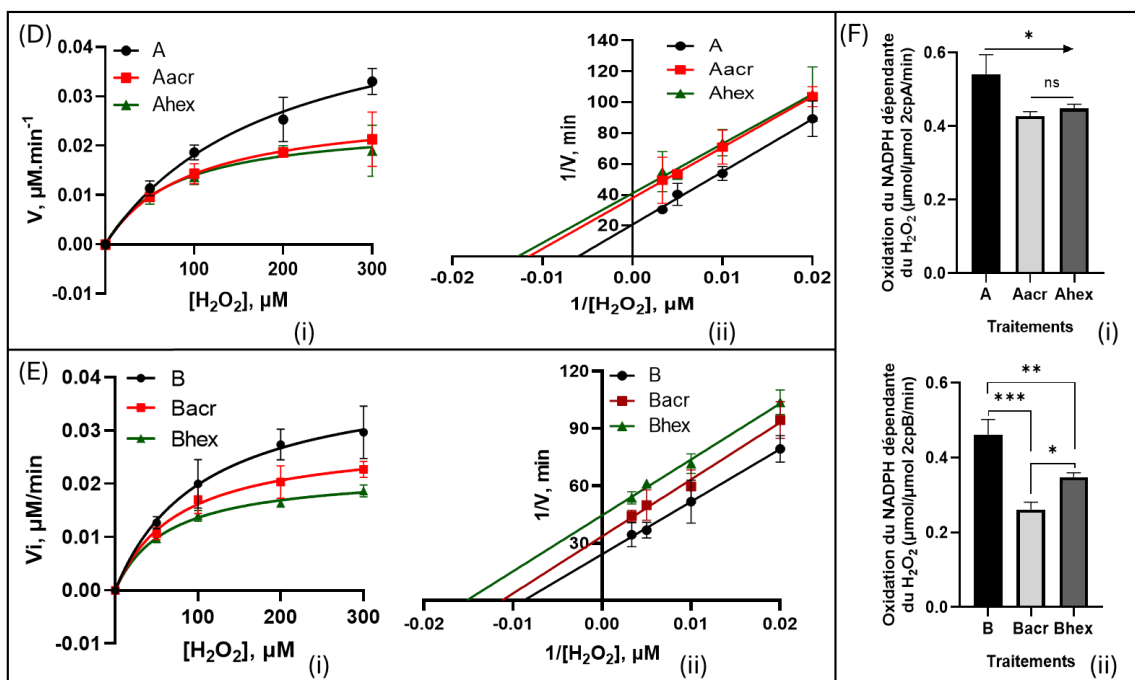


Figure 3. 12 : La carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine réduit l'efficacité et la vitesse catalytique de la 2cpA et de la 2cpB. (A) Le 2-hexenal et l'acroléine sont des aldéhydes α,β -insaturés (cadre violet sur la figure). Ce sont des électrophiles biologiques qui possèdent la capacité unique de former des liaisons covalentes avec les protéines (cadre vert sur la figure). Selon nos analyses *in silico*, les résidus Cys119, His208 et Cys241 de la 2cpA sont des cibles potentielles des deux aldéhydes α,β -insaturés. La conjugaison des aldéhydes α,β -insaturés au résidu Cys et His de la protéine crée de nouvelles liaisons covalentes de type C β -S et C β -N, respectivement. ## : Structures des adduits simples pouvant se former sur la protéine à la suite de sa carbonylation avec le 2-hexenal ou l'acroléine (addition 1:1 entre l'aldéhyde α,β -insaturé et l'acide aminé). (B) L'analyse de la fluorescence des Trp montrent que les protéines carbonylées changent de conformation lors du contact avec le H₂O₂, pareillement aux protéines non carbonylées (i-vi). Ceci est traduit sur les spectres par la diminution de l'intensité maximale de la fluorescence (I_{max}) et/ou par un changement de la longueur d'onde maximale d'émission des Trp (λ_{max}) lors du contact de la protéine avec le H₂O₂. Les valeurs séparées par un point-virgule représentent respectivement λ_{max} (en nm) et I_{max} . Les spectres correspondant à chaque temps de contact entre la protéine et le H₂O₂ sont représentés par une couleur différente (exemples : noir = 1 min ou 1' et rouge = 2 min ou 2'). Les symboles -Acr et -Hex désignent la carbonylation de la protéine avec l'acroléine et le 2-hexenal, respectivement. (C) Le temps de la réaction de carbonylation n'augmente pas significativement la capacité du 2-hexenal et de l'acroléine à réduire l'activité enzymatique spécifique de la 2cpA (i) et de la 2cpB (ii). (D-E) Le 2-hexenal et l'acroléine à 50 μ M affecte la cinétique enzymatique de la 2cpA (D) et de la 2cpB (E). (i) Les échantillons carbonylés exhibent, tout comme les échantillons non carbonylés, une cinétique enzymatique Michaelienne. (ii) Graphes de Lineweaver-Burk, double réciproque des graphes de Michaelis-Menten ($1/V = f(1/[S])$) ; ou V est la vitesse initiale de la réaction enzymatique, et [S] est la concentration du substrat, le H₂O₂). Nos résultats d'écrivent des formes d'inhibitions incompétitives, traduit par une modification de l'efficacité et de la vitesse catalytique maximales apparentes des

échantillons carbonylés, en comparaison aux échantillons non carbonylés. (F) Le 2-hexenal et l'acroléine à 50 μM provoquent une réduction de l'activité enzymatique spécifique de la 2cpA et de la 2cpB. Les protéines (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ont été incubées pendant 30 min à 30 °C dans du PBS contenant 10 mM d'EDTA, 200 μM de NADPH, 0,25 mM de Trx et 8 μM de TrxR. Ensuite, 50 μM de 2-hexenal/acroléine ont été ajoutés dans le milieu, et après 5 min d'incubation, la réaction enzymatique a été déclenchée avec 300 μM de H_2O_2 . Les résultats montrent que 50 μM entraîne une diminution significative de l'activité spécifique enzymatique des deux protéines. Les astérisques dénotent une différence significative, ANOVA à deux facteurs, test post hoc Tukey. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$; ns : non significatif.

Tableau 3. 6 : Récapitulatif des résultats de l'analyse de l'impact de la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine sur l'activité enzymatique de la 2cpA et de la 2cpB.

(i) Temps de la réaction de carbonylation vs activité enzymatique spécifique						
	2cpA			2cpB		
	Control*	Acr*	Hex*	Control*	Acr*	Hex*
1 h	0,539 \pm 0,024 a	0,341 \pm 0,012 b	0,348 \pm 0,024 b	0,557 \pm 0,024 a	0,334 \pm 0,053 b	0,334 \pm 0,021 b
2 h	0,529 \pm 0,024 a	0,290 \pm 0,039 b	0,327 \pm 0,060 b	0,537 \pm 0,036 a	0,315 \pm 0,011 b	0,284 \pm 0,017 b
3 h	0,533 \pm 0,031 a	0,240 \pm 0,035 c	0,328 \pm 0,037 b	0,543 \pm 0,042 a	0,262 \pm 0,039 b	0,273 \pm 0,010 b
4 h	0,517 \pm 0,022 a	0,257 \pm 0,052 b	0,321 \pm 0,011 b	0,519 \pm 0,025 a	0,226 \pm 0,037 b	0,251 \pm 0,016 b
(ii) Paramètres de la cinétique enzymatique des protéines						
	2cpA			2cpB		
	Control	Acr	Hex	Control	Acr	Hex
Vmax	0,056	0,028	0,022	0,041	0,029	0,022
Km	188,1	95,1	76,9	105,8	76,47	63,57
Kcat	0,28	0,14	0,11	0,21	0,15	0,11
Ki	-	58,14	46,3	-	72,5	60,24
AS	50	0,20 \pm 0,02a	0,19 \pm 0,01a	0,25 \pm 0,02a	0,21 \pm 0,02a	0,19 \pm 0,01a
	100	0,37 \pm 0,03a	0,29 \pm 0,04a	0,33 \pm 0,08a	0,34 \pm 0,05ab	0,28 \pm 0,02b
	200	0,51 \pm 0,09a	0,37 \pm 0,01b	0,38 \pm 0,02b	0,55 \pm 0,06a	0,41 \pm 0,06b
	300	0,66 \pm 0,05a	0,46 \pm 0,05b	0,35 \pm 0,05c	0,60 \pm 0,10a	0,37 \pm 0,02b
(iii) [Aldéhydes] vs activité enzymatique spécifique des protéines						
[Acroléine], μM						
	0	25	50	100	200	
2cpA	0,512 \pm 0,010 a	0,428 \pm 0,012 b	0,361 \pm 0,020 c	0,348 \pm 0,042 c	0,328 \pm 0,023 c	
2cpB	0,438 \pm 0,015 a	0,261 \pm 0,020 b	0,247 \pm 0,012 b	0,274 \pm 0,023 b	0,261 \pm 0,020 b	
[2-hexenal], μM						
	0	25	50	100	200	
2cpA	0,512 \pm 0,010 a	0,448 \pm 0,012 b	0,428 \pm 0,023 b	0,435 \pm 0,023 b	0,435 \pm 0,031 b	
2cpB	0,438 \pm 0,015 a	0,348 \pm 0,012 b	0,334 \pm 0,012 b	0,334 \pm 0,031 b	0,334 \pm 0,012 b	

Le tableau comprend trois parties montrant respectivement les résultats de l'analyse (i) de l'impact du temps de la réaction de la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine sur l'activité enzymatique spécifique de la

2cpA et de la 2cpB, (ii) l'impact de la carbonylation sur la cinétique enzymatique de la 2cpA et de la 2cpB et (iii) l'impact de la concentration du 2-hexenal et de l'acroléine sur l'activité enzymatique spécifique de la 2cpA et de la 2cpB. Se référer aux parties C-F de la **Figure 3.12** pour les conditions expérimentales et l'interprétation des données liées à chaque partie du tableau. Au sein d'une ligne, les lettres différentes dénotent une différence significative à $p < 0,05$; ANOVA à deux facteurs, test post hoc Tukey. Pour la partie (i) du tableau, l'astérisque dénote l'absence de différence significative au sein de la colonne. Les symboles -Acr et -Hex désignent la carbonylation de la protéine avec l'acroléine et le 2-hexenal, respectivement. $V_{max_{app}}$ = vitesse maximale (en $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) ; $K_{m_{app}}$ = constante de Michaelis-Menten (en μM) ; $K_{cat_{app}}$ = constante catalytique (en min^{-1}) ; $K_{i_{app}}$ = constante d'inhibition apparente. AS = activité enzymatique spécifique correspondant à 50-300 μM de H_2O_2 .

3.6.11. La carbonylation n'inhibe pas l'activité chaperonne et antioxydante de la 2cpA et de la 2cpB

Pour examiner l'impact de la carbonylation sur l'activité chaperonne et antioxydante de la 2-CysPrx, nous avons utilisé des échantillons de la 2cpA et de la 2cpB réduits (i.e. enrichis en monomères), puis carbonylés à 4 °C pendant 1 h avec 50 μM de 2-hexenal et d'acroléine, ainsi que l'ADN génomique d'*A. thaliana* (Col-0). Pour la détermination de l'activité chaperonne, le milieu réactionnel à base de PBS (pH 7,4) contenait 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protéine (2cpA/2cpB), 200 ng d'ADN, 10 mM d'EDTA et 300 μM de H_2O_2 . Pour la détermination de l'activité antioxydante, le milieu réactionnel contenait 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protéine, 200 ng d'ADN, 10 mM d'EDTA, 20 mM de DTT et 10 mM de FeCl_3 . Après 1 h d'incubation à 30 °C, les échantillons ont été analysés sur des gels d'agarose à 0,7%.

Concernant l'activité chaperonne examinée en présence de H_2O_2 , les résultats montrent que les deux protéines conservent cette activité biologique après la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine. En effet, pareillement aux échantillons de la 2cpA et de la 2cpB non carbonylés, l'analyse des gels montre une augmentation de la taille de l'ADN génomique en présence des échantillons carbonylés (**Figure 3.13A**) ; ce qui traduit que des chaperons se sont formées dans les différents échantillons et se sont liées à l'ADN pour le protéger contre le stress oxydatif. L'expérience similaire réalisée avec le BSA n'a pas donné le même résultat, montrant ainsi que cette protéine n'exhibe pas une activité chaperonne (**Figure 3.13A**). Nous avons ensuite repris l'expérience avec des échantillons protéiques non réduits (i.e. non enrichis en monomères) avant la réaction de carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine. La différence étant que les échantillons non réduits ne contiennent quasiment que des oligomères (dimères, pentamères, etc.) et voire des agrégats. Nous avons aussi utilisé l'ADN génomique de *Capsicum annuum* cv Margrethe

et de *Chlamydomonas reinhardtii* comme matériels biologiques supplémentaires. Nos résultats montrent que pareillement aux échantillons natifs de la 2cpA et de la 2cpB, tous les échantillons carbonylés exhibent une activité chaperonne (**Figure 3.13B**). Ceci est matérialisé sur le gel, par une augmentation de la taille de l'ADN génomique d'*A. thaliana*, en comparaison aux control positif (ADN + H₂O₂) et négatif (ADN seul). Aussi, les échantillons natifs de la 2cpA et de la 2cpB se lient à l'ADN génomique de *C. annuum* et de *C. reinhardtii* (**Figure 3.13B**), suggérant ainsi leur effet protecteur de l'ADN dans les conditions de stress oxydatif dans plusieurs taxa.

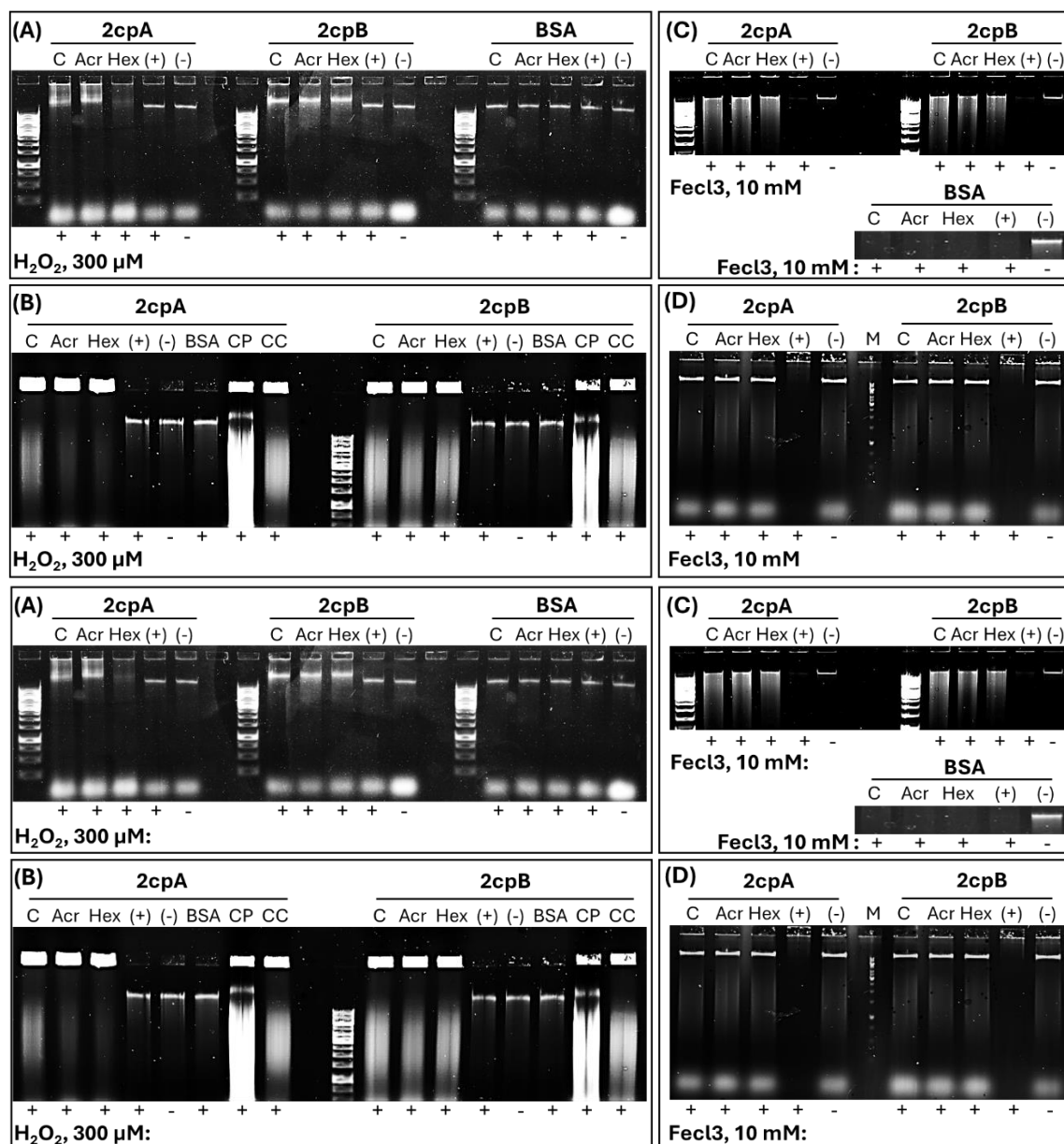


Figure 3. 13 : La carbonylation n'inhibe pas l'activité chaperonne et antioxydante de la 2cpA et de la 2cpB. Les échantillons utilisés dans ces expériences ont été réduits ou non avec le DTT avant la carbonylation à 4 °C pendant 1 h avec 50 μM de 2-hexenal/acroléine. Les ADN génomiques utilisés comme matériel biologique ont été extraits des feuilles d'*A. thaliana* et de *Capsicum annum*, et de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. (A) La détermination de l'activité chaperonne en présence de H_2O_2 des échantillons provenant de la carbonylation des protéines réduites montre que le 2-hexenal et l'acroléine n'inhibent pas la capacité de la 2cpA et de la 2cpB à protéger l'ADN génomique d'*A. thaliana* contre le stress oxydatif. Ceci est matérialisé sur le gel d'agarose par l'augmentation de la taille de l'ADN génomique uniquement en présence des protéines. L'expérience similaire avec le BSA n'a pas donné le même résultat, montrant ainsi qu'il ne possède pas une activité

chaperonne. C : échantillon non carbonylé ; Acr : échantillon carbonylé avec l'acroléine ; Hex : échantillon carbonylé avec le 2-hexenal ; (-) : control (ADN seul). Les signes + et – en dessous des gels indiquent la présence ou l'absence du H₂O₂ dans la réaction, respectivement. (B) L'expérience réalisée avec les échantillons carbonylés provenant des protéines non réduites a montré le même résultat que précédemment. Par ailleurs, l'augmentation sur le gel d'agarose de la taille de l'ADN génomique de *C. annuum* et de *C. reinhardtii* en présence des protéines non carbonylés valide les propriétés chaperon de la 2cpA et de la 2cpB observées avec l'ADN génomique d'*A. thaliana*. Pour les expériences, le milieu réactionnel à base de PBS (pH 7,4), contenait 0,2 µg/µL de protéines, 200 ng d'ADN, 10 mM d'EDTA et 300 µM de H₂O₂. Les échantillons ont été analysés sur un gel d'agarose à 0,7% après 1 h d'incubation à 30 °C et à 450 rpm. CP : échantillon non carbonylé incubé avec l'ADN génomique de *C. annuum* ; CC : échantillon non carbonylé incubé avec l'ADN génomique de *C. reinhardtii*. (C-D) Les analyses de la dégradation de l'ADN génomique d'*A. thaliana* par le FeCl₃ montre respectivement que les échantillons carbonylés provenant des protéines réduites ou non exhibent une activité antioxydante pareillement aux échantillons non carbonylés. Ceci est matérialisé sur les gels par la présence de l'ADN génomique uniquement dans les échantillons contenant les protéines et le control [(-) : ADN seul] en absence de FeCl₃, en comparaison au control en présence de FeCl₃. Ainsi, le 2-hexenal et l'acroléine n'inhibent pas le pouvoir antioxydant des deux protéines. L'expérience similaire avec le BSA n'a pas donné le même résultat, montrant ainsi que le BSA ne possède pas une activité antioxydante. Pour les expériences, le milieu contenait 0,2 µg/µL de protéines, 200 ng d'ADN, 10 mM de DTT, 10 mM d'EDTA et 10 mM de FeCl₃. Les échantillons ont été analysés sur un gel d'agarose à 0,7% après 1 h d'incubation à 30 °C et à 450 rpm. C : échantillon non carbonylé ; Acr : échantillon carbonylé avec l'acroléine ; Hex : échantillon carbonylé avec le 2-hexenal ; (-) : control (ADN seul). Les signes + et – en dessous des gels indiquent la présence ou l'absence du FeCl₃ dans la réaction.

Concernant l'activité antioxydante examinée en présence du FeCl₃, nos résultats montrent que pareillement aux échantillons non carbonylés de la 2cpA et de la 2cpB, les échantillons carbonylés avec le 2-hexenal et l'acroléine exhibent un pouvoir antioxydant (**Figure 3.13C**). En effet, en absence de la 2cpA/2cpB carbonylée ou non, le FeCl₃ provoque la dégradation totale de l'ADN génomique d'*A. thaliana*. L'expérience similaire réalisée avec le BSA n'a pas donné le même résultat, montrant ainsi que le BSA ne possède pas une activité antioxydante. Nous avons repris l'expérience avec des protéines non réduites avant la carbonylation, et nous avons obtenu des résultats similaires aux précédents, mais avec une meilleure efficacité des échantillons non réduits en comparaison aux échantillons réduits (**Figure 3.13D**). Nos résultats montrent ainsi que la carbonylation

induite avec le 2-hexenal et l'acroléine n'inhibe pas la capacité de la 2cpA et de la 2cpB à protéger l'ADN contre les dommages oxydatifs.

3.6.12. La carbonylation avec le 2-hexenal accroît la sensibilité de la 2cpA et de la 2cpB au protéasome

Pour examiner l'impact de la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine sur la sensibilité de la 2cpA et de la 2cpB à la dégradation par le protéasome, nous avons réduit les protéines avec le DTT, puis nous les avons carbonylés pendant 1 h à 4 °C avec 50 µM d'aldéhyde. Nous avons ensuite incubé pendant 1 h à 23 °C, à 450 rpm, 0,2 µg/µL de protéines carbonylées avec 0,2 µg/µL d'un extrait protéasomique provenant des feuilles d'*A. thaliana* double mutant pour les gènes de 2cpA et de la 2cpB. La dégradation des échantillons a également été suivie en présence du MG132 (inhibiteur de protéasome). Après l'incubation, les échantillons ont été chauffés à 95 °C pendant 5 min dans du tampon Laemmli 1X, puis analysés sur un gel de polyacrylamide à 12,5%. Les gels ont été visualisés avec le scanner Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager. Concernant les deux protéines (2cpA et 2cpB), nos résultats montrent que la dégradation de tous les échantillons carbonylés ou non s'effectue uniquement en absence du MG132 (**Figure 3.14A-B**). Toutefois, les échantillons de la 2cpA et de la 2cpB carbonylés avec le 2-hexenal présentent une plus grande sensibilité aux protéasomes, en comparaison aux échantillons non carbonylés et aux échantillons carbonylés avec l'acroléine. Aussi, les échantillons carbonylés avec l'acroléine montrent la plus faible sensibilité aux protéasomes présents dans la réaction (**Figure 3.14A-B**). Ainsi nos résultats montrent que la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine module la sensibilité de la 2cpA et de la 2cpB aux protéasomes.

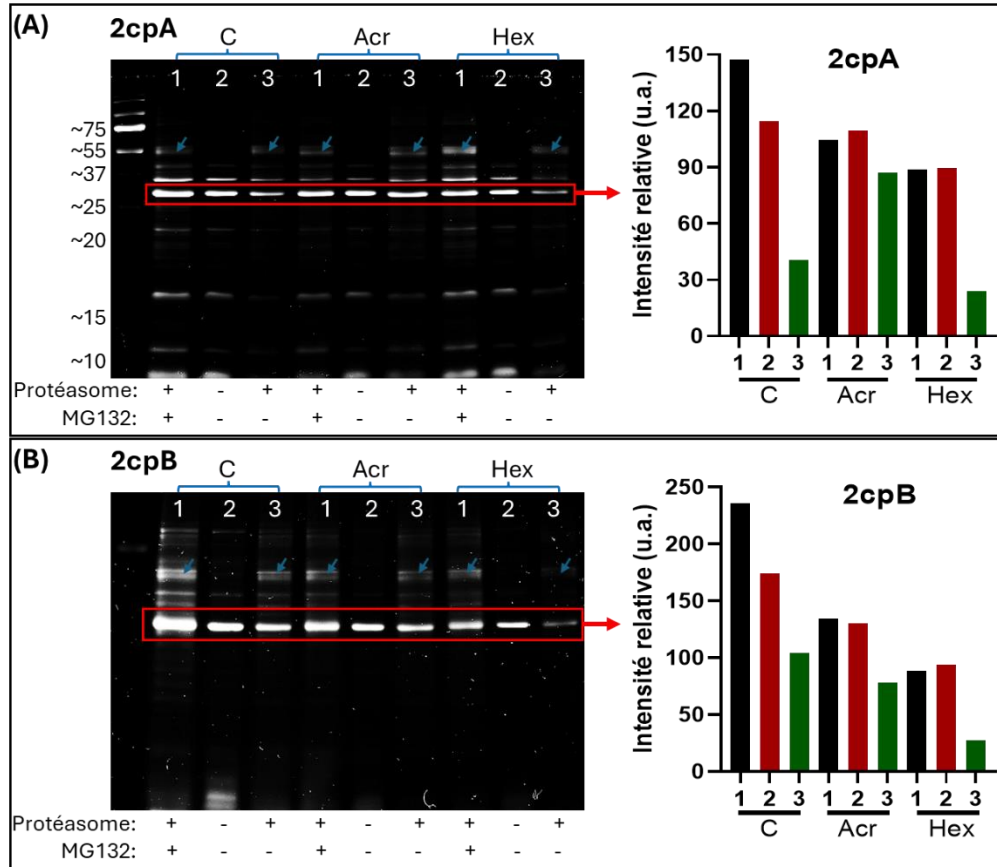


Figure 3. 14 : La carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine module la sensibilité de la 2cpA et de la 2cpB à la dégradation (A-B). La réaction contenait 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ d'échantillon de protéines et 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ d'extrait protéasomique provenant des feuilles d'*A. thaliana* double mutant pour les gènes de la 2cpA et de la 2cpB. La dégradation des protéines a également été suivie en présence de 1 μM de MG132. Après 1 h d'incubation à 23 °C, les échantillons ont été analysés sur un gel de polyacrylamide à 12,5%. Les résultats montrent que les échantillons carbonylés sont sensibles à l'extrait protéasomique en absence de MG132. C : échantillon non carbonylé ; Acr : échantillon carbonylé avec l'acroléine ; Hex : échantillon carbonylé avec le 2-hexenal. Les signes + et - en dessous des gels indiquent la présence ou l'absence du protéasome/MG132 dans la réaction. Les chiffres 1, 2 et 3 indiquent pour un échantillon les différentes conditions expérimentales, i.e. 1 et 3 pour l'échantillon en présence du protéasome et/ou du MG132, et 2 pour le contrôle interne de l'échantillon.

3.7. Discussion

Cette étude visait à élucider les conséquences mécanistiques de la carbonylation de la 2-CysPrx induite par des RCS. Au-delà de la simple caractérisation de l'oxydation protéique, nos travaux ont cherché à répondre à trois questions fondamentales : (i) Altération

structurelle : Comment la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine impacte-t-elle la dynamique de transition dimère-décamère de la 2-CysPrx ? (ii) Switch fonctionnel : La carbonylation induit-elle un basculement entre les activités peroxydase et chaperonne, redéfinissant ainsi le rôle de la protéine en situation de stress ? (iii) Contrôle qualité : La carbonylation constitue-t-elle un signal d'adressage spécifique pour la dégradation de la 2-CysPrx par le protéasome 20S ?

Le choix des RCS comme agents de carbonylation dans cette étude réside du fait la transition dimère-décamère — nécessaire pour la transition fonctionnelle peroxydase-chaperonne — de la 2-CysPrx est dépendante des groupements thiols des deux de cystéines ; ces dernières n'étant pas sensibles à la carbonylation directe par les ERO. Le 2-hexenal et l'acroléine sont des aldéhydes α,β -insaturés très réactifs produits dans la cellule au cours de la peroxydation des lipides (Esterbauer et al., 1991 ; Mello et al., 2007 ; Xu et al., 2021). Ces composés réagissent avec le groupement thiol libre de la cystéine et le groupe ϵ -amino de la lysine et de l'histidine au cours de la réaction d'addition de Michael pour former des carbonyles dans la structure de la protéine (Esterbauer et al., 1991 ; Uchida et al., 1998 ; Farmer et Davoine, 2007). Le principe de cette réaction d'addition supporte que le 2-hexenal et l'acroléine forment des liaisons covalentes avec la cystéine, la lysine et l'histidine pour former des carbonyles protéiques secondaires ; les carbonyles protéiques primaires étant générés par les ERO. De ce fait, les fonctions aldéhydes du 2-hexenal et de l'acroléine sont libres et disponibles pour réagir avec des agents de dérivatisation tels que le DNPH (2,4-Dinitrophénylhydrazine) et la Cy7.5-Hz (cyanine 7.5-hydrazide). Dans cette étude, nous avons utilisé la Cy7.5-Hz pour examiner *in vitro* la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine des protéines recombinantes 2cpA et 2cpB d'*A. thaliana* (**Figure 3.3E**). Cette sonde fluorescente a déjà été utilisée dans nos travaux précédents pour examiner le protéome carbonylé dans les feuilles d'*A. thaliana* en réponse à l'ABA, au H₂O₂ et à la disponibilité du fer (Fangue-Yapseu et al., 2022; Jaballi et Missihoun, 2022; Tola et Missihoun, 2023). Nos résultats ont montré que le 2-hexenal et l'acroléine induisent *in vitro* la carbonylation de la 2cpA et de la 2cpB, corroborant ainsi les résultats précédemment obtenus *in vivo* dans les feuilles d'*A. thaliana* (Fangue-Yapseu et al., 2022; Jaballi et Missihoun, 2022). Par ailleurs, l'analyse des groupements thiols libres avec le DTNB [acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)] ou réactif d'Ellman, ainsi que les résultats

de l'amarrage moléculaire, suggèrent que les cystéines de la 2cpA et de la 2cpB sont impliquées dans la réaction de carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine (**Figure 3.1C-D ; Figure 3.2C-D ; Tableau 3.1 ; Figure 3.4D**). Cette alkylation des cystéines de la 2cpA et de la 2cpB par le 2-hexenal et l'acroléine aurait un impact significatif sur la transition dimère-décamère, et par conséquent sur la stabilité et la transition fonctionnelle peroxydase-chaperonne des protéines. La structure cristalline de la 2cpA montre les résidus cystéines aux positions 119 et 241, respectivement (Yang et al., 2018). La Cys119 est logée dans le cœur hydrophobe de la protéine au niveau de la poche catalytique et sa chaîne latérale n'est pas accessible au solvant, contrairement à la Cys241 qui est logée sur la boucle dans la région C-terminale et dont la chaîne latérale est accessible au solvant (**Tableau 3.2**). Ainsi, la baisse des groupements thiols dans les échantillons carbonylés avec le 2-hexenal et l'acroléine pourrait uniquement impliquer le résidu Cys241. En effet, il a été rapporté que la chaîne latérale d'un acide aminé qui subit une modification post-traductionnelle préfère être accessible à la surface de la protéine (Ishii et al., 2003 ; Madian et Regnier, 2010 ; Pang et al., 2007). À notre connaissance, à l'exception de la Cys91 identifiée *in vitro* comme un site de carbonylation de la Prx-6 humaine, une 1-CysPrx, avec le 4-HNE et le 4-oxononanal (4-ONE) (Roede et al., 2008b), d'autres études n'ont pas identifiées les résidus de cystéine comme site de carbonylation des peroxirédoxines. À titre d'exemples, les cystéines de la Prx, de la 1-CysPrxA et de la PrxIII-1 des embryons d'*Oryza sativa*, la Prx TSA1 de *Saccharomyces cerevisiae* et la Prx-4 de *Rattus norvegicus* n'ont pas été retrouvées parmi les sites de carbonylation (Kim et al., 2010 ; Guo et al., 2011 ; Zhang et al., 2016) ; la lysine et l'histidine étant les principaux sites de carbonylation répertoriés. Nos différentes tentatives pour identifier les sites de carbonylation de la 2cpA et de la 2cpB avec le 2-hexenal n'ont pas été fructueuses. En cause, la couverture de la séquence des protéines n'a pas excédé 40% à chaque tentative (données non présentées). Nous ne savons pas si les deux peroxirédoxines sont résistante à la digestion par la trypsine, ou si le peptide portant l'adduit est perdu lors du dessalage avec la colonne C18 (i.e. qu'il est lavé ou n'est pas élué), ou simplement que le signal de ce peptide portant l'adduit est relativement trop faible pour être détecté. Les données actuelles dans la littérature montrent que le nombre de sites de carbonylation retrouvés sur des protéines de type peroxirédoxine est limité de 1 à 2 sites lorsque la protéine est carbonylée *in vitro* (Guo et al., 2011 ; Rao et

al., 2018 ; Roede et al., 2008). Cette remarque est la même pour les protéines de type thiorédoxine, qui sont également des protéines thiols connues pour leur rôle dans la régularisation de l'activité peroxydase des 2-CysPrx (Go et al., 2007 ; Han et al., 2007, 2012 ; Rao et al., 2018). Dans une étude parallèle, nous avons identifiés le résidu His208 comme l'unique site de carbonylation avec le 2-hexenal de la 2-CysPrx du poivron (ou THIOREDOXIN-DEPENDENT PEROXIREDOXIN) (donnée non présentée), montrant ainsi que ce résidu également identifié lors de nos analyses *in silico* avec le monomère de la 2cpA (**Tableau 3.1**) pourrait bien être un site prioritaire de la carbonylation *in vitro* du monomère de la 2cpA et la 2cpB avec le 2-hexenal. En effet, la 2-CysPrx du poivron et la 2cpA d'*A. thaliana* partagent 76,8% d'identité de séquence, et le résidu His208, ainsi que les résidus Cys119 et Cys241 sont conservés chez les deux espèces.

L'une des principales conséquences biologiques de la carbonylation des protéines est le changement de leur conformation native. Dans cette étude, nous avons examinés via des simulations de dynamique moléculaire l'impact de la carbonylation des résidus Cys119, His208 et Cys241 avec le 2-hexenal et l'acroléine sur la structure et la stabilité de la 2cpA. Nos résultats ont montré que la carbonylation de ces résidus entraîne inconditionnellement des changements plus ou moins importants de la taille de la protéine, perturbant ainsi sa structure quaternaire et le mouvement des atomes (**Figure 3.5 ; Tableau 3.3 ; Figure 3.6**). De même, en explorant via des simulations de dynamique moléculaire l'impact de la carbonylation avec le 4-HNE sur la structure du BSA et la thiorédoxine, Alviz-Amador et al. (2019) ont montré que la formation d'adduits de Michael Cys-4HNE, His-4HNE et Lys-4HNE induit des changements conformationnels locaux des deux protéines, et que ces changements diminuent la stabilité des protéines et augmentent la flexibilité locale, entraînant un léger dépliement de la structure des protéines. Nos résultats de simulation de dynamique moléculaire ont été corroborés par des analyses *in vitro*. En effet, en examinant la fluorescence intrinsèque et la distribution de la taille des particules de la 2cpA et de la 2cpB en solution grâce à la spectrofluorimétrie et le DLS, respectivement, nos résultats ont montré que la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine entraîne la modification de la conformation native (**Figure 3.7**), et affecte la taille et le comportement d'agrégation des deux protéines (**Figure 3.8 ; Figure 3.9**). Si la littérature scientifique relève que la modification des chaînes latérales des acides aminés affecte leur charge et leur taille, avec

des conséquences importantes sur la structure tridimensionnelle de la protéine (Jaisson et al., 2017), elle mentionne également que les protéines carbonylées ont une forte tendance à former des agrégats de haut poids moléculaire (Dalle-Donne et al., 2006; Nyström, 2005). Or dans cette étude, nos résultats de DLS ont montré que la carbonylation limite le comportement d'agrégation de la 2cpA et de la 2cpB à former des agrégats dans les conditions de stress oxydatif (**Figure 3.9**), ce qui peut avoir un impact significatif sur l'activité chaperonne des deux protéines. Nous pensons que cette faible aptitude d'agrégation de ces deux protéines est liée aux changements structuraux induits par le 2-hexenal et l'acroléine, lesquels changements perturbent les interactions entre les protéines hyperoxydées, et par conséquent la formation de macro-agrégats. L'activité chaperonne de la 2-CysPrx, ~~quant à elle~~, repose sur des oligomères de haut poids moléculaires organisés (décamères ou empilements de décamères de ~12 à 25 nm) — ces structures sont trop petites pour dominer le signal DLS comme le feraient de gros agrégats amorphes, mais elles sont les seules capables de lier les protéines clientes pour éviter leur dénaturation en cas de stress oxydatif. De ce fait, l'absence de signaux de macro-agrégats sur les tracés de DLS pourrait signifier que la carbonylation de la 2-CysPrx par le 2-hexenal ou l'acroléine induit une transition vers des oligomères de taille intermédiaire (décamères) hautement ordonnés (**Figures 3.9**). Ce comportement est cohérent avec le modèle de « switch fonctionnel » décrit pour les 2-CysPrx, où l'exposition de résidus hydrophobes post-oxydation favorise l'activité chaperonne au détriment de l'activité catalytique (Jang et al., 2004 ; Dietz, 2011 ; Liebthal et al., 2018). Ainsi, la carbonylation agirait comme un modulateur de structure de la 2-CysPrx, optimisant la fonction de protection cellulaire au moment précis où le stress oxydatif devient critique pour la plante.

Une autre conséquence importante de la carbonylation des protéines est la perte de leur activité enzymatique. Dans cette étude, nos résultats ont montré que malgré les changements structuraux dus à la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine, la 2cpA et de la 2cpB exécutent une activité enzymatique, mais avec une efficacité et une vitesse catalytique plus faible, en comparaison aux protéines non carbonylées (**Figure 3.12 ; Tableau 3.6**). En effet, les constantes catalytiques apparentes ($K_{m,app}$, $V_{max,app}$ et $K_{cat,app}$) et les activités enzymatiques spécifiques des protéines carbonylées sont plus faibles que celles des protéines non carbonylées. La diminution du $K_{m,app}$ et de la $V_{max,app}$, ainsi que

l'allure des graphes de Lineweaver-Burk (**Figure 3.12D-E, ii**), suggère ainsi une forme d'inhibition incompétitive. Ainsi, la carbonylation doit s'effectuer sur un ou plusieurs résidus hors du site actif des protéines. En effet, évaluant l'impact de l'addition d'aldéhyde sur l'activité peroxydase de la Prx-6 humaine, Roede et al. (2008) ont montré que la Cys47, site actif de la Prx-6, est résistante à la carbonylation avec le 4-HNE et le 4-ONE. Cependant, la carbonylation des résidus Cys91 et Lys209 par les deux aldéhydes entraîne une diminution de l'activité enzymatique de la Prx-6, montrant ainsi que la carbonylation d'un résidu se trouvant ailleurs que dans le site actif peut affecter l'activité enzymatique de la protéine. Ainsi, l'effet de la carbonylation sur l'activité enzymatique d'une protéine dépend du résidu carbonylé. Aussi, selon les données de simulations de dynamique moléculaire, Roede et al. (2008) ont montré que la carbonylation de la Cys91 par le 4-HNE et le 4-ONE entraîne un changement de conformation du site actif de la Prx-6. Par ailleurs, des études réalisées sur la thiorédoxine et la thiorédoxine réductase montrent que l'inactivation de ces deux protéines thiols est due à la modification de leurs résidus cystéine et sélénocystéine du site actif par le 4-HNE et l'acroléine (Fang et Holmgren, 2006). Pareillement, des travaux réalisés sur la Hsp72 et la Hsp90 montrent que la modification thiol est le mécanisme à l'origine de l'inactivation de ces deux protéines par le 4-HNE (Carbone et al., 2004, 2005). Ainsi, nos résultats montrant que les protéines 2cpA et 2cpB carbonylées avec le 2-hexenal et l'acroléine exécutent des activités chaperonnes et antioxydantes en protégeant l'ADN génomique d'*A. thaliana* contre le H₂O₂ et le FeCl₃, respectivement, valident ainsi que ces dernières sont résistantes à l'inactivation de leur cystéine peroxydatique par les aldéhydes (**Figure 3.13**). Il est connu que l'activité peroxydase de la 2-CysPrx régule ses autres fonctions (Morgan et Veal, 2007 ; Dietz, 2011). Des études montrent que la diminution de la capacité enzymatique d'une protéine est corrélée avec l'augmentation de la concentration de l'aldéhyde ; traduisant ainsi qu'une carbonylation sévère entraîne l'inactivation de la protéine (Guo et al., 2011 ; Roede et al., 2008). Dans notre contexte, l'augmentation de la concentration de l'aldéhyde de 25 à 200 µM, de même que le temps de la réaction de carbonylation de 1 à 4h n'a pas significativement accru l'effet inhibiteur du 2-hexenal et de l'acroléine sur l'activité enzymatique de la 2cpA et de la 2cpB, suggérant ainsi que les deux protéines doivent disposer d'un nombre restreint de résidus disponibles à leur surface pour la carbonylation

(Figure 3.12C et F). De même, nos résultats suggèrent que la réaction de carbonylation est soit extrêmement rapide, soit limitée par le ratio aldéhyde/enzyme plutôt que par la durée de l'exposition de la protéine à l'aldéhyde — le fait que l'activité enzymatique ne chute pas davantage entre 1-4h renforce l'idée d'une modification de résidus spécifiques plutôt qu'une dénaturation non spécifique progressive de la 2-CysPrx. Comme démontré avec l'acroléine sur l'activité enzymatique des peroxirédoxines, thiorédoxines et la thiorédoxine réductase des cellules épithéliales humaine (Myers et Myers, 2009), la carbonylation de la 2-CysPrx avec l'acroléine et le 2-hexenal serait aussi une inhibition covalente irréversible.

La carbonylation étant également connue pour avoir une incidence importante sur la stabilité thermique des protéines, nous avons évalué l'impact de la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine sur la stabilité thermique de la 2cpA et de la 2cpB. Nos résultats ont montré que la carbonylation accroît la stabilité thermique de la 2cpA et de la 2cpB en augmentant de 0,5 à 4,7 °C la température moyenne de stabilité thermique des échantillons avant l'hydroxydation, et de 1,4 à 6,4 °C après l'hydroxydation (à l'exception de la 2cpB carbonylée avec l'acroléine qui a une température moyenne de stabilité thermique de 0,7 °C plus petite que la protéine non carbonylée) (**Tableau 3.5**). L'effet de la carbonylation sur la stabilité thermique des protéines n'est pas encore clairement établi. Toutefois, les travaux de Miotto et al. (2019) suggèrent que la stabilité thermique d'une protéine est profondément liée à l'intensité des interactions et à leurs dispositions spatiales. Ainsi, nos résultats de spectrofluorimétrie et de DLS montrant que la carbonylation modifie la conformation native et la taille des protéines, respectivement, suggèrent que le 2-hexenal et l'acroléine liés doivent créer de nouvelles liaisons covalentes au sein de la protéine. Selon Estévez et al. (2022), ces liaisons covalentes s'établissent entre les fonctions aldéhydes libres des RCS liés et les groupes ϵ -amino libres des résidus de lysine. Par ailleurs, selon ces mêmes auteurs, les carbonyles protéiques formés par l'oxydation de la lysine sont très réactifs et participent à la formation de liaisons transversales. Les travaux de Roede et al. (2008) montrant que la réticulation de monomères de Prx-6 humaine est rendue possible via leurs résidus Cys91 et Lys209 carbonylés par le 4-HNE ou le 4-ONE valident cette assertion. Le réaménagement opéré dans la structure des protéines 2cpA et

2cpB après la carbonylation peut ainsi expliquer l'augmentation de leur température moyenne de stabilité thermique.

Nous avons finalement examiné dans cette étude l'impact de la carbonylation avec le 2-hexenal et l'acroléine sur la sensibilité de la 2cpA et de la 2cpB à la dégradation par le protéasome. Nos résultats ont montré que les protéines carbonylées ou non sont dégradées *in vitro* par l'extrait de protéasome en absence de MG132. Toutefois, les échantillons de la 2cpA et de la 2cpB carbonylés avec le 2-hexenal ont montré une plus grande sensibilité à la dégradation, en comparaison aux échantillons carbonylés avec l'acroléine et aux échantillons non carbonylés (**Figure 3.14**). La littérature renseigne que les protéines carbonylées ont tendance à former des agrégats de haut poids moléculaire résistants à la dégradation. Ces agrégats peuvent inhiber l'activité du protéasome, entraînant l'accumulation de protéines endommagées et déstabilisant davantage l'homéostasie des protéines cellulaires (Dalle-Donne et al., 2006; Nyström, 2005). La forte sensibilité à la dégradation des protéines carbonylées avec le 2-hexenal suggère ainsi une forte présence des structures de faibles poids moléculaire dans ces échantillons, en comparaison aux échantillons carbonylés avec l'acroléine et aux échantillons non carbonylés. Ainsi, nos résultats suggèrent que la carbonylation en modifiant la structure de base et en limitant le comportement d'agrégation de la 2cpA et de la 2cpB en solution peut ainsi jouer un rôle crucial dans leur recyclage par le protéasome. Bien que la carbonylation des protéines soit souvent associée à des effets négatifs, nos résultats montrent qu'elle fait également partie intégrante des processus cellulaires comme la régulation de l'homéostasie protéique, en particulier en réponse au stress oxydatif. Cela suggère que si la carbonylation peut être néfaste, elle joue également un rôle dans les processus physiologiques normaux chez les plantes, ce qui met en évidence la complexité de son impact sur la stabilité et la fonction des protéines.

En conclusion, nous montrons dans cette étude que la 2-CysPrx d'*A. thaliana* est une protéine sensible *in vitro* à la carbonylation induite avec les aldéhydes α,β -insaturés, le 2-hexenal et acroléine. Ceci corrobore nos analyses *in vivo* ayant permis de l'identifier dans les feuilles d'*A. thaliana* comme une protéine sensible à la carbonylation en réponse au H₂O₂ (Fangue-Yapseu et al., 2022). Le 2-hexenal et acroléine sont des produits de la

peroxydation des lipides. Ces molécules électrophiles sont capables de s'attacher aux résidus Cys, Lys et His des protéines via la formation de nouvelles liaisons covalentes de type C β -S et C β -N, respectivement. Les résultats de cette étude montrent que la carbonylation avec ces deux aldéhydes α,β -insaturés affecte la structure, la capacité d'agrégation et l'activité enzymatique de la 2-CysPrx d'*A. thaliana*, sans toutefois inhiber sa capacité chaperonne. Il se pose alors la question de savoir comment la carbonylation affecte l'organisation structurale et fonctionnelle de la molécule chaperonne de la 2-CysPrx. En effet, même si nos résultats montrent que les protéines 2cpA et 2cpB carbonylées se lient à l'ADN génomique d'*A. thaliana* dans les conditions de stress oxydatif, il reste à déterminer que cette liaison est réversible afin de valider le caractère chaperon de la 2-CysPrx carbonylée. Aussi, les travaux futurs pourraient s'intéresser à l'impact de la carbonylation sur la formation, l'organisation structurale et la dissociation des complexes de haut poids moléculaire de la 2-CysPrx, et également sur la capacité de cette protéine à interagir avec ses partenaires moléculaires dans différentes voies de signalisation. Les résultats permettront ainsi d'extrapoler l'impact de la carbonylation de la 2-CysPrx sur la régulation *in vivo* du mécanisme redox chez les plantes. En attendant, les résultats de nos travaux suggèrent que la carbonylation de la 2-CysPrx participent à la régulation de son activité enzymatique, de son homéostasie, et voir même de son rôle dans la signalisation cellulaire du H₂O₂, traduisant ainsi qu'il doit s'agir pour la plante d'une réponse adaptative post-oxydative jouant un rôle crucial dans le maintien de son équilibre physiologique — la carbonylation agirait donc comme est un « modulateur de structure » qui sacrifie une partie de l'activité catalytique pour optimiser la survie cellulaire (via la fonction chaperonne) et assurer le renouvellement protéique (via le protéasome 20S). Il est possible que la perte de l'activité enzymatique à la suite de la carbonylation aura un impact significatif sur le rôle physiologique de la 2cpA et de la 2cpB dans la régulation de la photosynthèse (voir discussion générale, chapitre IV).

3.8. Financement

Cette recherche a été financée par le Programme de subventions à la découverte du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), numéro de subvention DGEER-2019-00304 à Tagnon D. Missihoun.

3.9. Remerciements

Georges Y. Fangue-Yapseu exprime sa gratitude envers l'UQTR pour le soutien financier qu'il a reçu grâce aux bourses de la Fondation de l'UQTR. Georges Y. Fangue-Yapseu et Tagnon D. Missihoun remercient le Pr Francisco Javier Cejudo Fernandez (IBVF, Espagne) et le Pr Pascal Rey (CNRS, France) pour les avoir fournis les graines des mutants d'*Arabidopsis thaliana* pour les gènes de la peroxirédoxine, et l'anticorps anti-2-Cys peroxirédoxine, respectivement.

3.10. Conflit d'intérêt

Les auteurs déclarent que la recherche a été menée en l'absence de toute relation commerciale ou financière qui pourrait être interprétée comme un conflit d'intérêts potentiel.

3.11. Références

- Akagawa, M. (2021). Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radic Res* 55, 307–320. doi: 10.1080/10715762.2020.1851027
- Alviz-Amador, A., Galindo-Murillo, R., Pineda-Alemán, R., Pérez-González, H., Rodríguez-Cavallo, E., Vivas-Reyes, R., et al. (2019). 4-HNE carbonylation induces local conformational changes on bovine serum albumin and thioredoxin. A molecular dynamics study. *J Mol Graph Model* 86, 298–307. doi: 10.1016/j.jmglm.2018.11.001
- An, B. C., Lee, S. S., Lee, E. M., Lee, J. T., Wi, S. G., Jung, H. S., et al. (2010). A new antioxidant with dual functions as a peroxidase and chaperone in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cells* 29, 145–151. doi: 10.1007/s10059-010-0023-1
- Barranco-Medina, S., Lázaro, J. J., and Dietz, K. J. (2009). The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Lett* 583, 1809–1816. doi: 10.1016/j.febslet.2009.05.029
- Bekker, H., Berendsen, H. J. C., and Van Der Spoel, D. (1993). Gromacs: A parallel computer for molecular dynamics simulations. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/303803253>
- Biswas, M. S., Fukaki, H., Mori, I. C., Nakahara, K., and Mano, J. (2019). Reactive oxygen species and reactive carbonyl species constitute a feed-forward loop in auxin signaling for lateral root formation. *Plant Journal* 100, 536–548. doi: 10.1111/tbj.14456

- Biswas, M. S., and Mano, J. (2019). Reactive carbonyl species activate caspase-3-like protease to initiate programmed cell death in plants. *Plant & Cell Phys* 57, 1432-1442. doi:10.1093/pcp/pcw053
- Biswas, M. S., and Mano, J. (2021). Lipid peroxide-derived reactive carbonyl species as mediators of oxidative stress and signaling. *Front in Plant Sci* 12, 720867. doi: 10.3389/fpls.2021.720867
- Brockhinke, A., Plessow, R., Dittrich, P., and Kohse-Höinghaus, K. (2000). Analysis of the local conformation of proteins with two-dimensional fluorescence techniques. *Appl Phys B* 71, 755–763. doi: 10.1007/s003400000384
- Carbone, D. L., Doorn, J. A., Kiebler, Z., Ickes, B. R., and Petersen, D. R. (2005). Modification of Heat Shock Protein 90 by 4-Hydroxynonenal in a Rat Model of Chronic Alcoholic Liver Disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315, 8–15. doi: 10.1124/jpet.105.088088
- Carbone, D. L., Doorn, J. A., Kiebler, Z., Sampey, B. P., and Petersen, D. R. (2004). Inhibition of Hsp72-Mediated Protein Refolding by 4-Hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol* 17, 1459–1467. doi: 10.1021/tx049838g
- Cerveau, D., Ouahrani, D., Marok, M. A., Blanchard, L., and Rey, P. (2016). Physiological relevance of plant 2-Cys peroxiredoxin overoxidation level and oligomerization status. *Plant Cell Environ* 39. doi: 10.1111/pce.12596
- Ciacka, K., Tymiński, M., Gniazdowska, A., and Krasuska, U. (2020). Carbonylation of proteins—an element of plant ageing. *Planta* 252. doi: 10.1007/s00425-020-03414-1
- Colombo, G., Clerici, M., Garavaglia, M. E., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., et al. (2016). A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1019, 178–190. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.11.052
- Combes, G. F., Pellay, F. X., and Radman, M. (2020). Common cause and mechanism for all pathologies of aging? *Medecine/Sciences* 36, 1129–1134. doi: 10.1051/medsci/2020221
- Curtis, J. M., Hahn, W. S., Long, E. K., Burrill, J. S., Arriaga, E. A., and Bernlohr, D. A. (2012). Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.008
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* 10 (2), 389-406. doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x
- De Graff, A. M. R., Hazoglou, M. J., and Dill, K. A. (2016). Highly Charged Proteins: The Achilles' Heel of Aging Proteomes. *Structure* 24, 329–336. doi: 10.1016/j.str.2015.11.006

- Dietz, K. J. (2011). Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxid Redox Signal* 15, 1129–1159. doi: 10.1089/ars.2010.3657
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11, 81–128. doi: 10.1016/0891-5849(91)90192-6
- Estévez, M., Díaz-Velasco, S., and Martínez, R. (2022). Protein carbonylation in food and nutrition: a concise update. *Amino Ac* 54, 559–573. doi: 10.1007/s00726-021-03085-6
- Fang, J., and Holmgren, A. (2006). Inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase by 4-hydroxy-2-nonenal in vitro and in vivo. *J Am Chem Soc* 128, 1879–1885. doi: 10.1021/ja0573581
- Fangue-Yapseu, G. Y., Tola, A. J., and Missihoun, T. D. (2022). Proteome-wide analysis of hydrogen peroxide-induced protein carbonylation in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 13. doi: 10.3389/fpls.2022.1049681
- Farmer, E. E., and Davoine, C. (2007). Reactive electrophile species. *Curr Opin Plant Biol* 10, 380–386. doi: 10.1016/j.pbi.2007.04.019
- Fedorova, M., Bollineni, R. C., and Hoffmann, R. (2014). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev* 33, 79–97. doi: 10.1002/mas.21381
- Fritz, K. S., and Petersen, D. R. (2011). Exploring the biology of lipid peroxidation-derived protein carbonylation. *Chem Res Toxicol* 24. doi: 10.1021/tx200169n
- Ghisaidoobe, A. B. T., and Chung, S. J. (2014). Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on Förster resonance energy transfer techniques. *Int J Mol Sci* 15, 22518–22538. doi: 10.3390/ijms151222518
- Go, Y. M., Halvey, P. J., Hansen, J. M., Reed, M., Pohl, J., and Jones, D. P. (2007). Reactive aldehyde modification of thioredoxin-1 activates early steps of inflammation and cell adhesion. *American Journal of Pathology* 171, 1670–1681. doi: 10.2353/ajpath.2007.070218
- Guo, J., Prokai-Tatrai, K., Nguyen, V., Rauniyar, N., Ughy, B., and Prokai, L. (2011). Protein targets for carbonylation by 4-hydroxy-2-nonenal in rat liver mitochondria. *J Proteomics* 74, 2370–2379. doi: 10.1016/j.jprot.2011.07.009
- Han, B., Hare, M., Wickramasekara, S., Fang, Y., and Maier, C. S. (2012). A comparative “bottom up” proteomics strategy for the site-specific identification and quantification of protein modifications by electrophilic lipids. *J Proteomics* 75, 5724–5733. doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.029
- Han, B., Stevens, J. F., and Maier, C. S. (2007). Design, synthesis, and application of a hydrazide-functionalized isotope-coded affinity tag for the quantification of oxylipid-protein conjugates. *Anal Chem* 79, 3342–3354. doi: 10.1021/ac062262a

- Ishii, T., Tatsuda, E., Kumazawa, S., Nakayama, T., and Uchida, K. (2003). Molecular basis of enzyme inactivation by an endogenous electrophile 4-hydroxy-2-nonenal: Identification of modification sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 42, 3474–3480. doi: 10.1021/bi027172o
- Islam, M. M., Ye, W., Akter, F., Rhaman, M. S., Matsushima, D., Munemasa, S., et al. (2020). Reactive carbonyl species mediate methyl jasmonate-induced stomatal closure. *Plant Cell Physiol* 61. doi: 10.1093/PCP/PCAA107
- Islam, M. M., Ye, W., Matsushima, D., Munemasa, S., Okuma, E., Nakamura, Y., et al. (2016). Reactive carbonyl species mediate ABA signaling in guard cells. *Plant Cell Physiol* 57. doi: 10.1093/pcp/pcw166
- Jaballi, A., and Missihoun, T. D. (2022). The phytohormone abscisic acid modulates protein carbonylation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 174. doi: 10.1111/ppl.13658
- Jaisson, S., Desmons, A., Gorisse, L., and Gillery, P. (2017). Protein molecular aging: Which role in physiopathology? *Medecine/Sciences* 33. doi: 10.1051/medsci/20173302013
- Knieper, M., Vogelsang, L., Guntelmann, T., Sproß, J., Gröger, H., Viehhauser, A., et al. (2022). OPDAylation of Thiols of the Redox Regulatory Network In Vitro. *Antioxidants* 11. doi: 10.3390/antiox11050855
- König, J., Lotte, K., Plessow, R., Brockhinke, A., Baier, M., and Dietz, K. J. (2003). Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin: Role of the C terminus and the quaternary structure. *Journal of Biological Chemistry* 278, 24409–24420. doi: 10.1074/jbc.M301145200
- Lee (2005). 2-Cysteine peroxiredoxin complex exhibiting function acting as molecular chaperone and uses thereof. International application published under the patent cooperation treaty, WO 2005/116082. 98p
- Lee, J. T., Lee, S. S., Mondal, S., Tripathi, B. N., Kim, S., Lee, K. W., et al. (2016). Enhancement of the chaperone activity of alkyl hydroperoxide reductase C from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from a point-specific mutation confers heat tolerance in *Escherichia coli*. *Mol Cells* 39, 594–602. doi: 10.14348/molcells.2016.0042
- Li, B. B., Zhang, S. B., Lv, Y. Y., Wei, S., and Hu, Y. Sen (2022). Reactive oxygen species-induced protein carbonylation promotes deterioration of physiological activity of wheat seeds. *PLoS One* 17. doi: 10.1371/journal.pone.0263553
- Li, Y., Tomko, R. J., and Hochstrasser, M. (2015). Proteasomes: Isolation and activity assays. *Curr Protoc Cell Biol* 2015, 3.43.1-3.43.20. doi: 10.1002/0471143030.cb0343s67

- Liebthal, M., Maynard, D., and Dietz, K. J. (2018). Proxiredoxins and Redox Signaling in Plants. *Antioxid Redox Signal* 28. doi: 10.1089/ars.2017.7164
- Liebthal, M., Strüve, M., Li, X., Hertle, Y., Maynard, D., Hellweg, T., et al. (2016). Redox-dependent conformational dynamics of decameric 2-cysteine peroxiredoxin and its interaction with cyclophilin 20-3. *Plant Cell Physiol* 57, 1415–1425. doi: 10.1093/pcp/pcw031
- Madian, A. G., and Regnier, F. E. (2010). Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J Proteome Res* 9, 3766–3780. doi: 10.1021/pr1002609
- Mano, J., Biswas, S., and Sugimoto, K. (2019). Reactive carbonyl species: A missing link in ROS signaling. *Plants* 8, 391. doi:10.3390/plants8100391
- Mello, C. F., Sultana, R., Piroddi, M., Cai, J., Pierce, W. M., Klein, J. B., et al. (2007). Acrolein induces selective protein carbonylation in synaptosomes. *Neuroscience*, 147(3), 674-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.04.003
- Michael (1887). Ueber die addition von natriumacetessig- und natriummalonsäureäthern zu den aethern ungesättigter säuren. *J Prakt Chem*, 35, 349–356. doi:10.1002/prac.18870350136
- Miotto, M., Olimpieri, P. P., Di Rienzo, L., Ambrosetti, F., Corsi, P., Lepore, R., et al. (2019). Insights on protein thermal stability: A graph representation of molecular interactions. *Bioinformatics* 35, 2569–2577. doi: 10.1093/bioinformatics/bty1011
- Morgan, B. A., and Veal, E. A. (2007). Functions of typical 2-Cys peroxiredoxins in yeast. *Subcell Biochem*, 44, 253-65. doi: 10.1007/978-1-4020-6051-9_12.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R., and Olson, A. J. (1996). Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4. *J Comput Aided Mol Des* 10, 293–304. doi: 10.1007/BF00124499
- Müller, S. M., Wang, S., Telman, W., Liebthal, M., Schnitzer, H., Viehhauser, A., et al. (2017). The redox-sensitive module of cyclophilin 20-3, 2-cysteine peroxiredoxin and cysteine synthase integrates sulfur metabolism and oxylipin signaling in the high light acclimation response. *Plant Journal* 91. doi: 10.1111/tpj.13622
- Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO Journal* 24, 1311–1317. doi: 10.1038/sj.emboj.7600599
- Pang, C. N. I., Hayen, A., and Wilkins, M. R. (2007). Surface accessibility of protein post-translational modifications. *J Proteome Res* 6, 1833–1845. doi: 10.1021/pr060674u
- Pulido, P., Spínola, M. C., Kirchsteiger, K., Guinea, M., Pascual, M. B., Sahrawy, M., et al. (2010). Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *J Exp Bot* 61. doi: 10.1093/jxb/erq218

- Rao, R. S. P., Zhang, N., Xu, D., and Møller, I. M. (2018). CarbonylDB: a curated data-resource of protein carbonylation sites. *Bioinformatics* 34, 2518–2520. doi: 10.1093/bioinformatics/bty123
- Roede, J. R., Carbone, D. L., Doorn, J. A., Kirichenko, O. V., Reigan, P., and Petersen, D. R. (2008). In vitro and in silico characterization of peroxiredoxin 6 modified by 4-Hydroxynonenal and 4-Oxononenal. *Chem Res Toxicol* 21, 2289–2299. doi: 10.1021/tx800244u
- Schöning-Stierand, K., Diedrich, K., Fährrolfes, R., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., et al. (2020). ProteinsPlus: Interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Res* 48, W48–W53. doi: 10.1093/NAR/GKAA235
- Starke-Reed1, P. E., and Oliver, C. N. (1989). Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*, 275(2), 559-67. doi: 10.1016/0003-9861(89)90402-5.
- Sultana, Most. S., Sakurai, C., Biswas, Md. S., Szabados, L., and Mano, J. (2024). Accumulation of reactive carbonyl species in roots as the primary cause of salt stress-induced growth retardation of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 176. doi: 10.1111/ppl.14198
- Teixeira, F., Castro, H., Cruz, T., Tse, E., Koldewey, P., Southworth, D. R., et al. (2015). Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial chaperone reservoir in *Leishmania infantum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E616–E624. doi: 10.1073/pnas.1419682112
- Tola, A. J., Jaballi, A., and Missihoun, T. D. (2021). Protein carbonylation: Emerging roles in plant redox biology and future prospects. *Plants* 10. doi: 10.3390/plants10071451
- Tola, A. J., and Missihoun, T. D. (2023). Iron availability influences protein carbonylation in *Arabidopsis thaliana* Plants. *Int J Mol Sci* 24. doi: 10.3390/ijms24119732
- Trott, O., and Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31, 455–461. doi: 10.1002/jcc.21334
- Uchida, K., Kanematsu, M., Sakai, K., Matsuda, T., Hattori, N., Mizuno, Y., et al. (1998). Protein-bound acrolein: Potential markers for oxidative stress *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(9), 4882-7. doi: 10.1073/pnas.95.9.4882.
- Xu, Y., Tong, Z., Zhang, X., Zhang, X., Luo, Z., Shao, W., et al. (2021). Plant volatile organic compound (E)-2-hexenal facilitates *Botrytis cinerea* infection of fruits by inducing sulfate assimilation. *New Phytologist* 231, 432–446. doi: 10.1111/nph.17378
- Yang, Y., Cai, W., Wang, J., Pan, W., Liu, L., Wang, M., et al. (2018). Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* peroxiredoxin A C119S mutant. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 74, 625–631. doi: 10.1107/S2053230X18010920

- Yoshida, K., Hara, A., Sugiura, K., Fukaya, Y., and Hisabori, T. (2018). Thioredoxin-like2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade supports oxidative thiol modulation in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115. doi: 10.1073/pnas.1808284115
- Zhang, H., He, D., Yu, J., Li, M., Damaris, R. N., Gupta, R., et al. (2016). Analysis of dynamic protein carbonylation in rice embryo during germination through AP-SWATH. *Proteomics* 16, 989–1000. doi: 10.1002/pmic.201500248

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

4.1. Discussion générale

4.1.1. Le schéma de carbonylation des protéines dépend du signal perçu par la plante

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une espèce réactive de l'oxygène (ERO) stable et capable de diffuser librement ou via les peroxyporines dans tous les compartiments cellulaires en raison, respectivement, de sa demi-vie relativement longue et de sa neutralité (Bersweiler, 2015 ; Mittler, 2017). C'est un oxydant faible qui ne réagit qu'avec des cibles spécifiques, notamment les peroxydases thiols connues pour leur rôle important dans les voies de transduction du signal (Reddie et Carroll, 2008 ; Meng et al., 2021), ce qui fait de lui un messenger important dans l'activation de nombreux processus métaboliques et physiologiques dans la cellule (Dröge, 2002 ; Giorgio et al., 2007 ; Mhamdi et al., 2010 ; Schieber et Chandel, 2014 ; Elhiti et Stasolla, 2015). Cependant, son métabolisme peut générer le radical hydroxyle (OH^\bullet) en présence du Fe^{2+} au cours de la réaction de Fenton, une réaction non enzymatique catalysée par un métal (Mittler, 2017). Le OH^\bullet est un oxydant puissant qui réagit de manière non spécifique avec tous les matériaux biologiques de la cellule (lipides, protéines, ADN, etc.) (Gardès-Albert, 2006 ; Migdal et Serres, 2011 ; Mittler, 2017). Ainsi, les effets délétères du H_2O_2 sont liés à sa conversion en OH^\bullet par le Fe^{2+} . Dans le cas de la carbonylation des protéines, qui se définit comme une modification post-traductionnelle non enzymatique et irréversible due à l'action directe ou indirecte des ERO, les travaux de Tola et Missihoun (2023) ont montré que le contrôle du pool de fer par la plante modifie le schéma de la carbonylation des protéines. En effet, chez les plantes sauvages d'*A. thaliana* et les mutants pour les trois gènes de la ferritine (*Fer-1-3-4*), la supplémentation du milieu de culture en fer a entraîné une augmentation significative de la concentration intracellulaire de fer, et par conséquent, une augmentation significative du niveau de carbonylation des protéines dans les feuilles, montrant ainsi l'importance du fer dans ce processus biologique. Cependant, une carence en fer a diminué significativement le niveau de carbonylation des protéines chez la plante sauvage mais pas chez le mutant, montrant ainsi le rôle des gènes de la ferritine dans la séquestration et la distribution du fer.

Également, les travaux de Tola et Missihoun (2023) ont démontré que les changements observés dans le schéma de la carbonylation des protéines chez les plantes cultivées dans des conditions normales sont dus à des fluctuations des pools de fer plutôt qu'au stress oxydatif. Dans nos travaux, nous montrons que le niveau de carbonylation des protéines dans les feuilles d'*A. thaliana* est modulé par la concentration de H₂O₂. En effet, l'application foliaire de H₂O₂ (0-50 mM) sur les semis d'*A. thaliana* a entraîné des changements dans le schéma de carbonylation des protéines. Grâce à l'analyse LC-MS/MS, nous avons identifié 35 protéines uniquement carbonylées dans les feuilles des semis traités au H₂O₂, et 39 protéines uniquement carbonylées lorsque les semis n'étaient pas traités. Par ailleurs, jusqu'à 3% des protéines identifiées dans les échantillons traités au H₂O₂ étaient localisées dans le noyau, contre 0% pour les échantillons non traités. Les résultats de nos travaux démontrent ainsi que le H₂O₂ modifie le schéma de carbonylation des protéines dans les feuilles d'*A. thaliana*. Dans le même sens, d'autres études réalisées au sein de notre équipe de recherche ont permis d'identifier 26 protéines uniquement carbonylées dans les feuilles d'*A. thaliana* en réponse à l'ABA (Jaballi et Missihoun, 2022) et huit protéines uniquement carbonylées en réponse à une carence en fer (Tola et Missihoun, 2023). En effectuant une analyse croisée des résultats de notre équipe de recherche, nous avons identifié la 2-CysPrx et l'ascorbate peroxydase comme deux protéines communément carbonylées dans les feuilles d'*A. thaliana* en réponse au H₂O₂ et à l'ABA, et la NADPH-protochlorophyllide oxydoréductase comme l'unique protéine carbonylée dans les feuilles d'*A. thaliana* en réponse au H₂O₂ et à la carence en fer (**Annexe D-i**). Sachant que l'ABA est souvent impliqué dans la perception du stress chez les plantes et que la carence en fer peut induire le stress via la perturbation de l'activité des chaînes photosynthétiques et respiratoires, nos travaux suggèrent ainsi que les cibles protéiques carbonylées sont choisies en fonction du type d'interaction ligand-récepteur formé dans la membrane plasmique. En effet, les interactions ligand-récepteur activent des cascades spécifiques de protéines kinases dont les intervenants sont choisis rigoureusement, et le plus souvent, selon l'intensité du stress (Meng et al., 2021 ; Dizengremel, 2023). Toujours en comparant les résultats de nos différentes études, nous avons observé que des cibles protéiques nucléaires et mitochondriales ont été carbonylées en réponse au H₂O₂, mais pas en réponse à l'ABA et à la carence en fer. Cependant, aucune cible protéique extracellulaire

et membranaire n'a été carbonylée en réponse au H₂O₂ comme cela a été le cas, respectivement, en réponse à l'ABA et à la carence en fer (**Annexe D-ii**). Ceci suggère une fois de plus que le choix des cibles protéiques qui sont carbonylées dépend de l'interaction ligand-récepteur et des seconds messagers recrutés, validant ainsi que le schéma de carbonylation des protéines dépend du signal perçu par la plante.

4.1.2. La carbonylation des protéines joue un rôle crucial dans la transduction du signal du H₂O₂

La transduction du signal est un processus biochimique qui permet à une cellule de réagir de manière appropriée à un stimulus externe. Ce mécanisme utilise des messagers secondaires comme l'AMPc et le Ca²⁺ pour déclencher une cascade de réactions conduisant à l'élaboration d'une réponse spécifique, comme la modification de l'expression génique ou la carbonylation des protéines. Concernant la carbonylation des protéines, elle a été définie par Wong et al. (2008) comme un mécanisme de signalisation redox. En effet, ces chercheurs ont démontré dans leurs travaux que la carbonylation de l'annexine A1, une protéine qui favorise l'apoptose et inhibe la croissance cellulaire, assure la croissance et la survie des cellules musculaires lisses vasculaires dans la voie de transduction du signal de l'endothéline-1, et que cette signalisation est médiée par la réaction de Fenton dépendante du H₂O₂ et du fer. Il est important de souligner que l'annexine A1 carbonylée est rapidement dégradée par le protéasome 20S (Wong et al., 2008). D'autres exemples montrant l'importance de la carbonylation des protéines dans la signalisation redox sont bien décrits dans la littérature scientifique. C'est le cas de la carbonylation de la protéine Keap1 et de la thiorédoxine par le 4-HNE, un dérivé carbonylé réactif (RCS : reactive carbonyl specie) jouant le rôle de second messenger en aval du H₂O₂, qui entraîne, respectivement, l'activation de la transcription d'une variété de cibles génétiques antioxydantes et pro-inflammatoires (Curtis et al., 2012). Ainsi, ces exemples démontrent que les événements de carbonylation des protéines jouent des rôles fonctionnels importants dans les cellules. Dans nos travaux, nous avons identifié 35 protéines carbonylées dans les feuilles d'*A. thaliana* en réponse au H₂O₂. Ces protéines carbonylées étaient distinctement enrichies dans les processus biologiques tels que la réponse du système immunitaire, la réponse de défense et la réponse à un stimulus externe, suggérant ainsi que la carbonylation

des protéines participe à la transduction du signal du H₂O₂ chez les plantes. Par ailleurs, l'identification de l'ascorbate peroxydase et de la 2-CysPrx parmi les cibles protéiques carbonylées en réponse au H₂O₂ soulève des questions sur l'importance de leur carbonylation dans la régulation du mécanisme redox chez les plantes. Il s'agit en effet de deux protéines participant à la détoxification cellulaire du H₂O₂. C'est pourquoi nous avons entrepris dans cette thèse de déterminer l'impact de la carbonylation sur l'activité et la stabilité de la 2-CysPrx (2cpA et 2cpB) d'*A. thaliana*. Pour cela, nous avons choisi d'induire la carbonylation de la 2cpA et de la 2cpB avec le 2-hexenal et l'acroléine, qui sont des agents de carbonylation susceptibles de s'attacher de manière covalente aux résidus cystéines de ces deux protéines. En effet, la 2cpA et la 2cpB sont des peroxydases thiol-dépendantes et leur activité catalytique est rattachée à deux résidus de cystéine, dont l'un est conservé dans la région N-terminale, la Cys peroxydatique, et l'autre dans la région C-terminale, la Cys résolutive (Dietz, 2011). Les résultats que nous avons obtenus à l'aide des analyses de spectrofluorimétrie et de diffusion dynamique de la lumière ont montré que la carbonylation des protéines 2cpA et 2cpB avec le 2-hexenal et l'acroléine provoque des changements significatifs dans la conformation native, la structure quaternaire, la distribution de la taille moléculaire et le comportement d'agrégation des protéines. Malgré ces altérations, les protéines 2cpA et 2cpB ont exécuté une activité enzymatique, mais avec une capacité et une vitesse plus faible que les protéines non carbonylées. Aussi, les protéines carbonylées ont exécuté des activités chaperonnes — l'activité chaperonne trouvée ici vis-à-vis de l'ADN est à notre connaissance la toute première documentation d'une telle capacité de la 2-CysPrx ; il reste que cette activité doit être validée avec les protéines clientes — et antioxydantes en protégeant l'ADN génomique d'*A. thaliana* contre le H₂O₂ et le FeCl₃. Cependant, la carbonylation a augmenté la sensibilité à la dégradation par le protéasome de la 2cpA et de la 2cpB carbonylées avec le 2-hexenal, tandis que les protéines carbonylées avec l'acroléine ont été plus résistantes. Ces résultats montrent que la carbonylation intervient dans l'homéostasie des protéines cellulaires. Finalement, observant que les protéines carbonylées identifiées dans les échantillons non traités étaient distinctement enrichies dans les processus de la photosynthèse, tandis que celles identifiées dans les échantillons traités au H₂O₂ étaient distinctement enrichies dans les mécanismes de défense, nous pensons que la carbonylation des protéines dans la signalisation redox

permet de réguler ou d'adapter convenablement la réponse de la plante au H₂O₂. Dans le même sens, Tola et Missihoun (2023), identifiant comme protéines carbonylées en réponse à la carence en fer chez *A. thaliana* le récepteur de la kinase C activée 1 (RACK1) et les protéines ribosomales RPL15 (*60S RIBOSOMAL PROTEIN L15-1*), RPL5 (*50S RIBOSOMAL PROTEIN L5*) et RPS2 (*30S RIBOSOMAL PROTEIN S2*), ont conclu que la carbonylation de ces protéines pourrait servir à réprimer la traduction chez les plantes souffrant d'une carence en fer.

4.2. Conclusion générale

Dans cette thèse, nous démontrons que le H₂O₂ modifie le schéma de carbonylation des protéines dans les feuilles d'*A. thaliana* et que cette modification post-traductionnelle non enzymatique et irréversible participe au mécanisme de la transduction du signal du H₂O₂ chez les plantes. En effet, nous avons identifié 35 protéines uniquement carbonylées dans les feuilles des plantes traitées avec le H₂O₂, et l'analyse ontologique génique a révélé que ces protéines étaient distinctement enrichies dans les processus biologiques tels que la réponse du système immunitaire, la réponse de défense et la réponse à un stimulus externe. Nous démontrons également dans cette thèse que la carbonylation provoque des changements significatifs dans la conformation native, la structure quaternaire, la distribution de la taille moléculaire et le comportement d'agrégation de la 2cpA et de la 2cpB d'*A. thaliana* sans toutefois inhiber complètement son activité enzymatique, et sans désactiver ses propriétés chaperonne et antioxydante. Cependant, la carbonylation avec le 2-hexenal augmente la sensibilité de cette peroxydase thiol-dépendante à la dégradation par le protéasome. Ainsi, nos résultats suggèrent que la carbonylation des protéines joue un rôle crucial dans la signalisation cellulaire redox associée au H₂O₂ chez les plantes. Ainsi, loin de n'être qu'un dommage oxydatif irréversible, la carbonylation des protéines, telle que nous la présentons dans cette thèse, s'avère être un véritable mécanisme de modulation de la signalisation redox chez les plantes. Les modifications observées *in vivo* sur le carbonylome des feuilles traitées avec le H₂O₂, et *in vitro* sur la 2-CysPrx traitée avec le 2-hexenal ou l'acroléine, suggèrent que la carbonylation pourrait agir comme un « levier régulateur » influençant l'équilibre Trx_{ox}/Trx_{red} et, par conséquent, l'activation ou la désactivation des enzymes du cycle de Calvin. En effet, les 2-CysPrx participent à

l'inactivation oxydative rapide des enzymes du chloroplaste en causant le transfert des équivalents réducteurs des enzymes réduites, via les Trx, vers le peroxyde d'hydrogène. Ce contrôle de la photosynthèse par les 2-CysPrx se déroule aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité. Toutefois, pendant la lumière, les 2-CysPrx reçoivent principalement les électrons de NTRC, ce qui réduit considérablement leur effet oxydant des enzymes de la photosynthèse. Ainsi, en présence de la lumière, le système redox NTRC–2-CysPrx aide à ajuster finement l'état redox des enzymes du chloroplaste, modulant ainsi la performance photosynthétique aux variations de lumière (Perez-Ruiz et al., 2017 ; Ojeda et al., 2018 ; Cejudo et al., 2021 ; Yokochi et al., 2021 ; Yoshida et al., 2021; Lampl et al., 2022). Sur la base des résultats décrits dans cette thèse, nous proposons un model conceptuel (**Figure 4.1**) dans lequel la carbonylation, en inhibant la formation des dimères et l'activité des 2-CysPrx, empêcherait le drainage des électrons des enzymes de la photosynthèse par les 2-CysPrx. Le model propose ainsi que la carbonylation de la 2-CysPrx agit comme un mécanisme activateur de la photosynthèse en maintenant l'état réduit des enzymes du cycle de Calvin. Ce mécanisme sera fortement influencé par le niveau de H₂O₂, donc de la 2-CysPrx carbonylée. Ce modèle, nous l'espérons, ouvrira la voie à une réinterprétation de la carbonylation chez les plantes comme « acteur fonctionnel » de la régulation photosynthétique, et non plus comme simple marqueur du stress oxydatif.

Enfin, ce travail pose les fondations pour des recherches futures visant à identifier *in vivo* les sites de carbonylation des protéines, comprendre leurs effets sur la dynamique des interactions redox, et explorer comment les plantes utilisent cette modification pour renforcer leur résilience face au stress biotique et/ou abiotique.

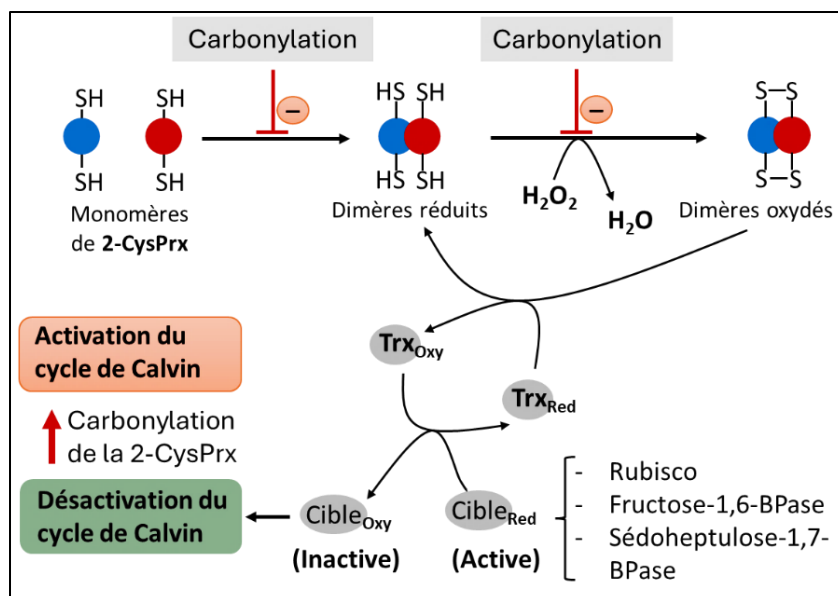


Figure 4.1 : Modèle conceptuel illustrant l'impact potentiel de la carbonylation sur la 2-CysPrx et, en aval, sur la régulation redox du cycle de Calvin. La carbonylation de la 2-CysPrx, induite par le H₂O₂ ou les RCS (ex., acroléine ou 2-hexenal), perturbe sa capacité à former un dimère (voir un pentamère) fonctionnel et réduit son activité peroxydase. Cette altération modifierait l'équilibre Trx_{Oxy}/Trx_{Red}, diminuant la désactivation redox des enzymes clés du cycle de Calvin (FBPase, SBPase, Rubisco, etc.) pendant la journée. Le schéma propose ainsi que la carbonylation de la 2-CysPrx agirait comme un mécanisme activateur de la photosynthèse en maintenant l'état réduit des enzymes du cycle de Calvin.

4.3. Perspectives

Dans cette thèse, nous avons identifié de nombreuses protéines sensibles à la carbonylation en réponse au H₂O₂. Nous avons utilisé le H₂O₂ pour identifier les protéines carbonylées dans les feuilles d'*A. thaliana* car il s'agit d'un point convergent à plusieurs facteurs de stress environnementaux. Il reste toutefois incertain si les facteurs de stress, pris individuellement ou combinés dans l'environnement de la plante conduiraient à l'identification des mêmes protéines carbonylées. Des comparaisons du protéome carbonylé en réponse à divers stress avec celui décrit dans le chapitre II de cette thèse permettront d'identifier les spécificités de chaque stress et son impact sur la carbonylation des protéines. Par ailleurs, nous avons ensuite recherché parmi ces protéines identifiées celles qui étaient modifiées par des RCS connus. Nous avons ainsi retrouvé six protéines modifiées par le cinnamaldéhyde, le β-cyclocitral, le 4-HNE, le MDA ou l'acroléine (**Annexe I**). Pour ces six protéines, nous avons pu identifier les sites de carbonylation. Il

s'agit par exemple du résidu His432 carbonylé par l'acroléine pour le récepteur de la glutamate (AT3G04110) et du résidu Cys403 carbonylé par le MDA pour la protéine de la famille du domaine C1 riche en cystéine/histidine (AT3G46810). Lorsque nous avons entrepris cette analyse, nous espérons obtenir de meilleurs résultats, c'est-à-dire de retrouver un plus grand nombre de protéines modifiées par les RCS. Malheureusement, la plante produit un grand nombre de RCS dont tous ne sont pas encore connus. De ce fait, il est peut-être nécessaire de développer une méthode d'analyse robuste permettant de déterminer la masse exacte d'un adduit, en soustrayant le produit m/z obtenu par LC-MS/MS de la masse réelle de la séquence peptidique. Le résultat de cette soustraction permettrait ainsi d'effectuer des recherches de similitudes avec d'autres RCS connus afin de prédire la structure probable de l'adduit qui n'a pas été identifié.

En travaillant avec la 2-CysPrx (2cpA et 2cpB), nous avons démontré que cette protéine est sensible *in vitro* à la carbonylation avec le 2-hexenal. Cependant, après plusieurs analyses LC-MS/MS, nous n'avons pas réussi à identifier le ou les sites de carbonylation de la 2cpA et de la 2cpB. Nous avons donc formulé plusieurs hypothèses : (i) la 2-CysPrx est résistante à la digestion par la trypsine, (ii) les adduits sont perdus avec la colonne C18, (iii) les adduits affectent l'ionisation des peptides, une étape cruciale de l'analyse LC-MS/MS, (iv) les peptides portant les adduits ne sont simplement pas identifiés du fait de leur concentration relativement trop faible. Au regard de ces hypothèses, nous pensons qu'il est nécessaire de développer une approche robuste de protéomique ciblée (*Top-down proteomics*) pour l'identification des sites de carbonylation de la 2-CysPrx carbonylée avec un RCS comme le 2-hexenal. L'identification de ces sites de carbonylation est indispensable car il s'agit de la première étape vers les études de mutagenèse dirigée pour la découverte mécanistique permettant de combler le fossé entre « dommage » et « fonction » de la carbonylation des protéines.

Finalement, pour améliorer cette thèse, il serait important d'examiner d'une part l'impact de la carbonylation sur la capacité d'interaction de la 2cpA et de la 2cpB avec leurs partenaires moléculaires dans différentes voies de signalisation, et ainsi de valider, se faisant notre modèle conceptuel décrit plus haut. D'autre part, les études futures devront porter sur la détermination de l'impact de cette carbonylation sur la formation, l'organisation structurale, le fonctionnement et la dissociation des complexes de haut poids

moléculaire de la 2-CysPrx, afin de déterminer si la carbonylation entrave ou non l'activité chaperonne de la protéine.

4.4. Références

- Bersweiler Antoine (2015). Les peroxydases à thiol, relais dans la signalisation cellulaire redox associée au peroxyde d'hydrogène : Mécanismes moléculaires responsables de la spécificité de l'activation du facteur de transcription Yap1 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat de l'Université de Lorraine, soutenue le 9 décembre 2015. 207p
- Cejudo, F. J., Gonzalez, MC., and Perez-Ruiz, J. M. (2021). Redox regulation of chloroplast metabolism. *Plant Physiology* 186, 9-21. doi: 10.1093/plphys/kiab062
- Curtis, J. M., Hahn, W. S., Long, E. K., Burrill, J. S., Arriaga, E. A., and Bernlohr, D. A. (2012). Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.008
- Dietz, K. J. (2011). Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxid Redox Signal* 15, 1129–1159. doi: 10.1089/ars.2010.3657
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001
- Elhiti, M., and Stasolla, C. (2015). “ROS Signalling in Plant Embryogenesis,” 197–214. doi: 10.1007/978-3-319-10079-1_10
- Gardès-Albert, M. (2006). Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. *Ann Pharm Fr* 64, 365–372. doi: 10.1016/S0003-4509(06)75331-7
- Jaballi, A., and Missihoun, T. D. (2022). The phytohormone abscisic acid modulates protein carbonylation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 174. doi: 10.1111/ppl.13658
- Marco Giorgio, Mirella Trinei, Enrica Migliaccio, and Pier Giuseppe Pelicci (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9), 722-8. doi:10.1038/nrm2240
- Meng, J., Fu, L., Liu, K., Tian, C., Wu, Z., Jung, Y., et al. (2021). Global profiling of distinct cysteine redox forms reveals wide-ranging redox regulation in *C. elegans*. *Nat Commun* 12. doi: 10.1038/s41467-021-21686-3
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., and Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: A focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61, 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282

- Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Medecine/Sciences* 27, 405–412. doi: 10.1051/medsci/2011274017
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends Plant Sci* 22, 11–19. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002
- Myers, C.R., and Myers, M.J. (2009). The effects of acrolein on peroxiredoxins, thioredoxins, and thioredoxin reductase in human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 257, 95-104. doi: 10.1016/j.tox.2008.12.013
- Ojeda, V., Perez-Ruiz, J. M., and Cejudo, J. F. (2018). 2-Cys peroxiredoxins participate in the oxidation of chloroplast enzymes in the dark. *Molecular Plant* 11, 1377-1388. doi: 10.1016/j.molp.2018.09.005
- Perez-Ruiz, J. M., Naranjo, B., Ojeda, V., Guinea, M., and Cejudo, F. J. (2017). NTRC-dependent redox balance of 2-Cys peroxiredoxins is needed for optimal function of the photosynthetic apparatus. *Plant Biology* 114, 12069-12074. doi: 10.1073/pnas.1706003114
- Pierre Dizengremel (2023). Contraintes environnementales et stress oxydant chez les plantes. Encyclopédie de l'environnement, 1–21. Consulté le 8 mai 2025, [en ligne ISSN 2555-0950]
- Reddie, K. G., and Carroll, K. S. (2008). Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr Opin Chem Biol* 12, 746–754. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.07.028
- Schieber, M., and Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology* 24. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034
- Tola, A. J., and Missihoun, T. D. (2023). Iron Availability Influences Protein Carbonylation in *Arabidopsis thaliana* Plants. *Int J Mol Sci* 24. doi: 10.3390/ijms24119732
- Yokochi, Y., Fukushi, Y., Wakabayashi, KI., Yoshida, K., and Hisabori, T. (2021). Oxidative regulation of chloroplast enzymes by thioredoxin and thioredoxin-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 118, e2114952118. doi: 10.1073/pnas.2114952118
- Yoshida, K., Hara, A., Sugiura, K., Fukaya, Y., and Hisabori, T. (2018). Thioredoxin-like 2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade support oxidative thiol modulation in chloroplasts. *PNAS* 115, E8296-E8303. doi: 10.1073/pnas.1808284115
- Wong, C. M., Cheema, A. K., Zhang, L., and Suzuki, Y. J. (2008). Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circ Res* 102. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.159814

ANNEXES

Dans cette partie, nous présentons quelques méthodologies et résultats qui n'ont pas été inclus dans les chapitres II et III.

Annexe A : Stratégie opérationnelle utilisée pour l'objectif spécifique 1 portant sur l'identification des protéines sensibles à la carbonylation induite par le H₂O₂

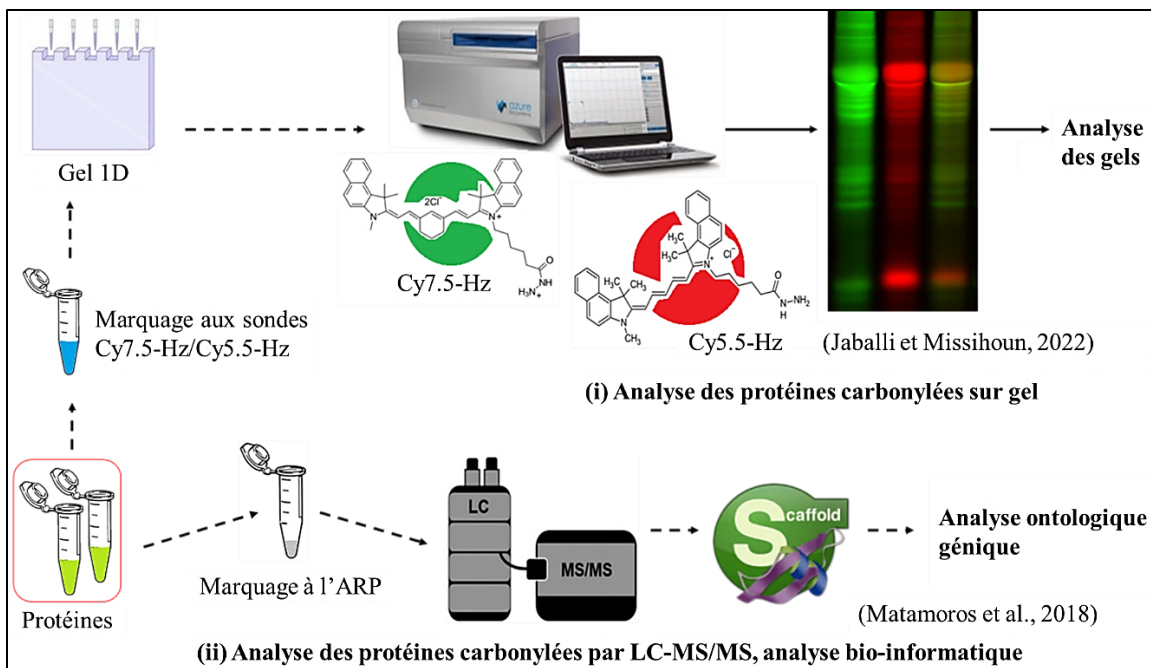


Figure A 1 : Résumé de la stratégie opérationnelle employée pour la réalisation de l'objectif spécifique 1. Les protéines extraites des feuilles d'*A. thaliana* âgés de 14 jrs et traités avec du H₂O₂ ont été analysées sur gel et par LC-MS/MS. Pour l'analyse sur gel, les échantillons ont été marqué avec les sondes fluorescentes de cyanine hydrazide (Cy7.5-Hz et Cy5.5-Hz). Pour l'analyse LC-MS/MS, les échantillons ont été marqué à la sonde réactive aux aldéhydes (ARP, *aldehydes reactive probe*). Après l'analyse LC-MS/MS, une analyse ontologique génétique a été effectuée pour déterminer les processus biologiques et les fonctions moléculaires affectés par la carbonylation des protéines identifiées.

Annexe B : La carbonylation des protéines dans les feuilles d'*A. thaliana* est rythmée sur le cycle circadien de la plante

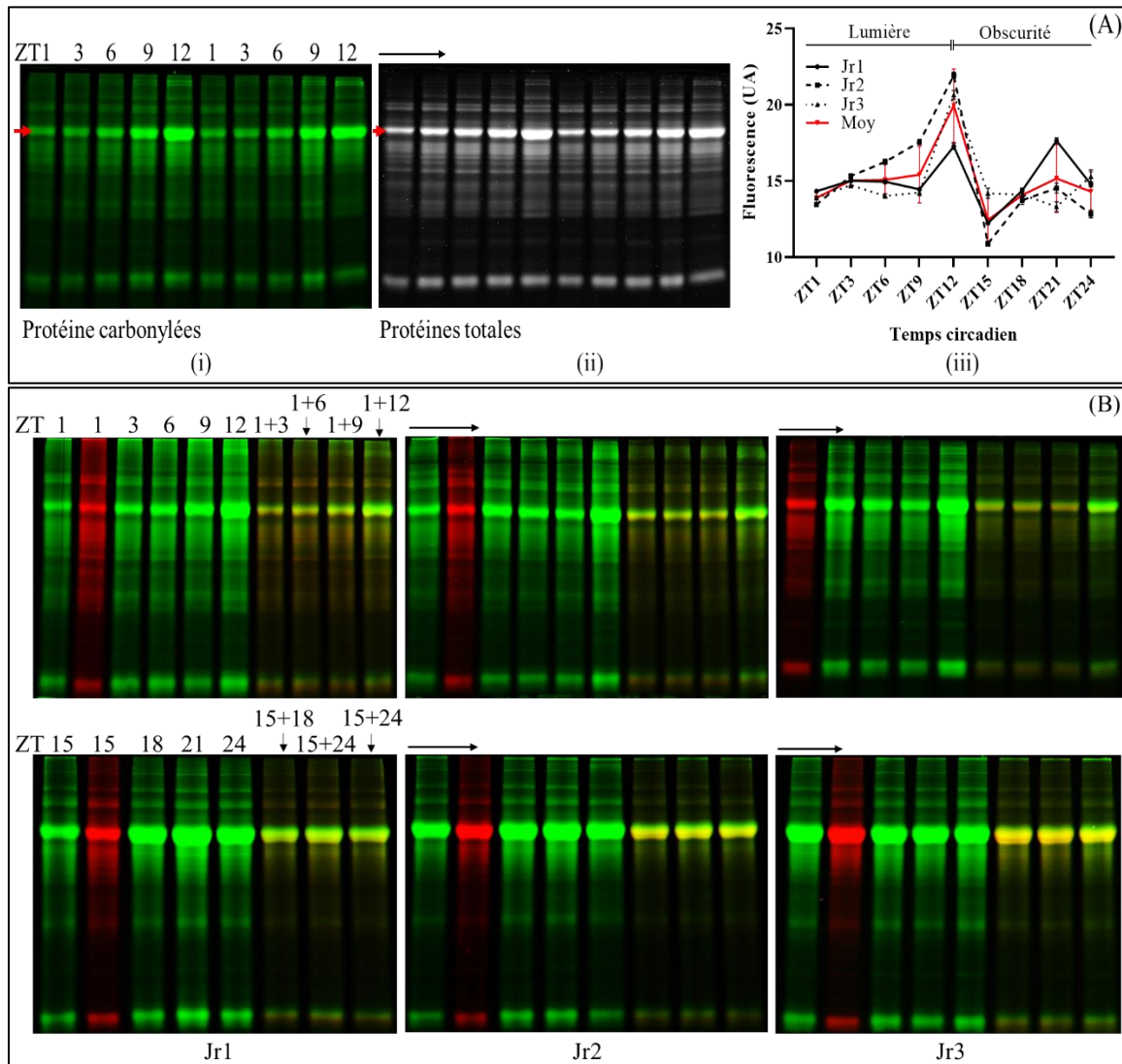


Figure A 2 : La carbonylation des protéines est rythmée sur le cycle circadien de la plante. Les plantes ont été cultivées dans le Conviron GEN1000 selon les conditions suivantes : cycle jr/nuit : 12/12 h ; température jr/nuit : 21/18 °C ; humidité relative jr/nuit : 60/65 % ; luminosité : 80 %. Les échantillons de feuilles ont été récoltés à différents repères temporels ou temps circadien (ZT, *Zeitgeber time* : ZT1 à ZT24 qui correspondent chacun une heure précise de la journée ; exemple, ZT1 correspond à 1 h après le début de la journée) lorsque les semis étaient âgés de 14 à 16 jrs (récolte consécutive pendant 3 jrs). Les protéines ont été extraites et marquées avec les sondes Cy7.5-Hz et Cy5.5-Hz avant d'être analysées sur des gels de polyacrylamide à 12,5%. (A) Pour la quantification du niveau de carbonylation des protéines, tous les échantillons ont été marqués avec la Cy7.5-Hz. Après la séparation, le gel a été scanner à 784 nm pour les protéines carbonylées, en

associant la couleur verte à la Cy7.5-Hz (i), et à 520 nm pour les protéines totales, en associant la couleur grise à la sonde de fixation Azure-red (ii). Les résultats obtenus montrent que le niveau de carbonylation des protéines augmente progressivement au cours de la phase de lumière (jour) pour atteindre son maximum à ZT12 qui marque la transition entre le jour et la nuit (iii). Cependant, dans la période d'obscurité (nuit), le pic de carbonylation est atteint à ZT21, soit 3 h avant l'ouverture de la lumière. Aussi le graphe montre que les niveaux de carbonylation des protéines 3 h après l'ouverture de la lumière (ZT3) et 3 h après sa fermeture (ZT15) sont plus faible que les périodes en aval. Finalement, les gels montrent que le niveau de carbonylation de la Rubisco (voir flèche rouge sur les gels) est proportionnel à sa production au cours de la journée. (B) Pour comparer qualitativement les échantillons, nous avons utilisé ceux de ZT1 et ZT15 comme des références pour le jour et la nuit, respectivement. De ce fait, ces échantillons ont été marqués avec les deux sondes. Ensuite, 5 µg d'échantillon marqué à la Cy5.5-Hz a été mélangé à 5 µg d'échantillons marqué à la Cy7.5-Hz, et le volume résultant a été chargé dans le puit du gel. Après la séparation, le gel a été scanner à deux longueurs d'ondes pour la détection des protéines carbonylées ; soit un scan multiplex à 658 et à 784 nm, en associant la couleur rouge à la Cy5.5 et la couleur verte à la Cy7.5. Les résultats obtenus montrent que pour certaines protéines, le niveau de carbonylation reste sensiblement le même au cours de la journée (bande de couleur jaune à orange sur les lignes de mélange ; par exemple : 1+3, jour, et 15+18, nuit), tandis que pour d'autres, le niveau de carbonylation est accentué (bandes de couleur vertes sur les lignes de mélange). Ces résultats montrent ainsi que le H₂O₂-intracellulaire module le schéma de la carbonylation des protéines au cours de la journée.

Annexe C : Le traitement des semis d'*A. thaliana* avec le H₂O₂-exogène entraîne l'augmentation de la concentration du H₂O₂-intracellulaire, mais pas celle de l'O₂⁻, et modifie le schéma d'expression des protéines dans les feuilles

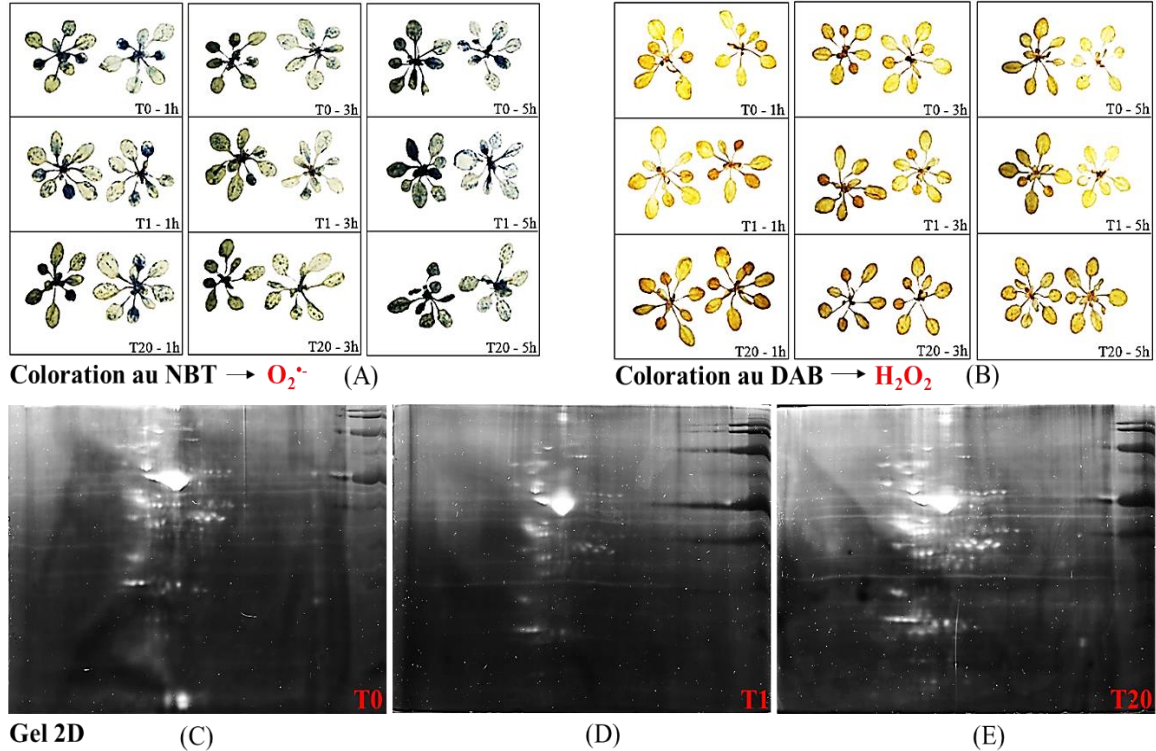


Figure A 3 : Effet du H₂O₂-exogène sur la teneur intracellulaire de l'O₂⁻ et du H₂O₂, et sur l'expression des protéines dans les feuilles d'*A. thaliana*. (A) Le H₂O₂ exogène ne change pas la concentration intracellulaire de l'O₂⁻ dans les semis d'*A. thaliana*. Les semis ont été colorés avec le bleu de tétrazolium (NBT, *nitro blue tetrazolium*), puis photographiés et analysés. (B) Le H₂O₂ exogène change la concentration intracellulaire du H₂O₂ dans les semis d'*A. thaliana*. Les semis ont été colorés avec le 3,3-diaminobenzidine (DAB), puis photographiés et analysés. L'analyse des images montre que, contrairement au H₂O₂ à 1 mM (T1), le H₂O₂ à 20 mM (T20) a provoqué une augmentation significative de la concentration intracellulaire du H₂O₂, et ce, dès 1 h après le traitement, en comparaison au contrôle (T0). Trois heures (3 h) après le traitement, l'effet du H₂O₂ exogène était totalement dissipé, et la production intracellulaire du H₂O₂ était contrôlée par la SOD qui catalyse la dismutation de l'O₂⁻ en H₂O₂. Au regard de ces résultats, nous avons récolté les échantillons de plantes 1 h après le traitement des semis pour l'analyse du protéome. (C, D, E) Gels 2D présentant le schéma d'expression des protéines dans les feuilles d'*A. thaliana* en fonction de la concentration du H₂O₂ exogène. Les images montrent un nuage de protéines beaucoup plus dense pour les feuilles traitées avec le H₂O₂ à 20 mM (T20), par rapport à celles traitées avec le H₂O₂ à 1 mM (T1) et le contrôle (T0). Ainsi, le H₂O₂ change le schéma d'expression des protéines dans les feuilles.

Annexe D : Mini-métanalyse des travaux effectués dans notre équipe de recherche. Ces travaux ont été publiés dans les revues scientifiques (Jaballi et Missihoun, 2022 ; Fangue-Yapseu et al., 2022 ; Tola et Missihoun, 2023).

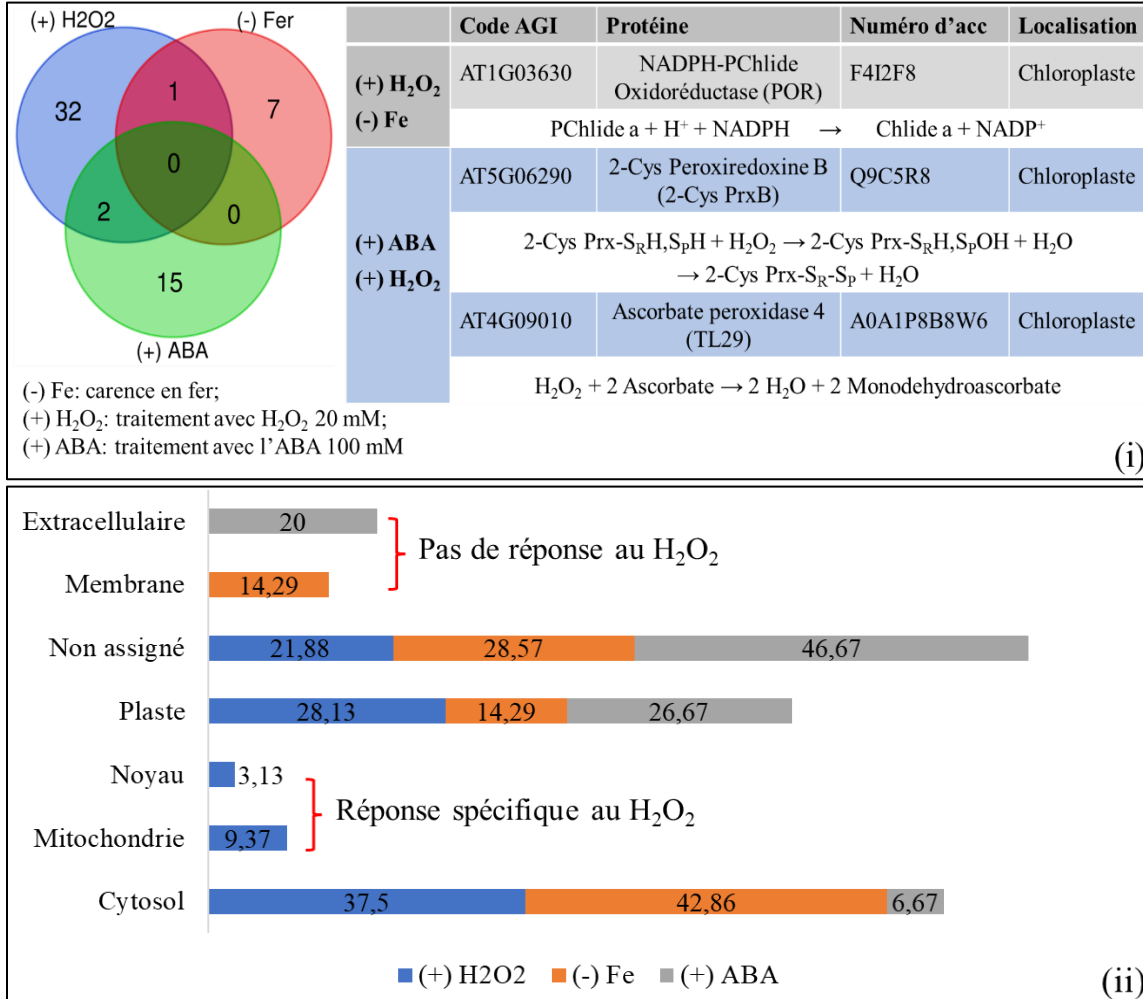


Figure A 4 : L'analyse croisée des résultats des travaux de notre équipe de recherche présente la 2-Cys Prx et l'ascorbate peroxydase comme des protéines communément carbonylées dans les feuilles d'*A. thaliana* en réponse au H₂O₂ et à l'ABA, et la NADPH-protochlorophyllide oxydoréductase comme l'unique protéine carbonylée dans les feuilles d'*A. thaliana* en réponse au H₂O₂ et à la carence en fer. Par ailleurs, l'analyse montre également que des cibles protéiques nucléaires et mitochondriales ont été carbonylées en réponse au H₂O₂, mais pas en réponse à l'ABA et à la carence en fer. Cependant, aucune cible protéique extracellulaire et membranaire n'a été carbonylée en réponse au H₂O₂ comme cela a été le cas, respectivement, en réponse à l'ABA et à la carence en fer. Ceci démontre que le choix des cibles protéiques qui sont carbonylées dépend de l'interaction ligand-récepteur et des seconds messagers recrutés, validant ainsi que le schéma de carbonylation dépend du signal perçu par la plante, et voir même de son intensité.

Annexe E : Résumé de la méthodologie utilisée pour l'analyse *in silico* de l'interaction entre les RCS, 2-hexenal et acroléine, et la 2-Cys Prx A d'*A. thaliana* (PDB : 5ZTE)

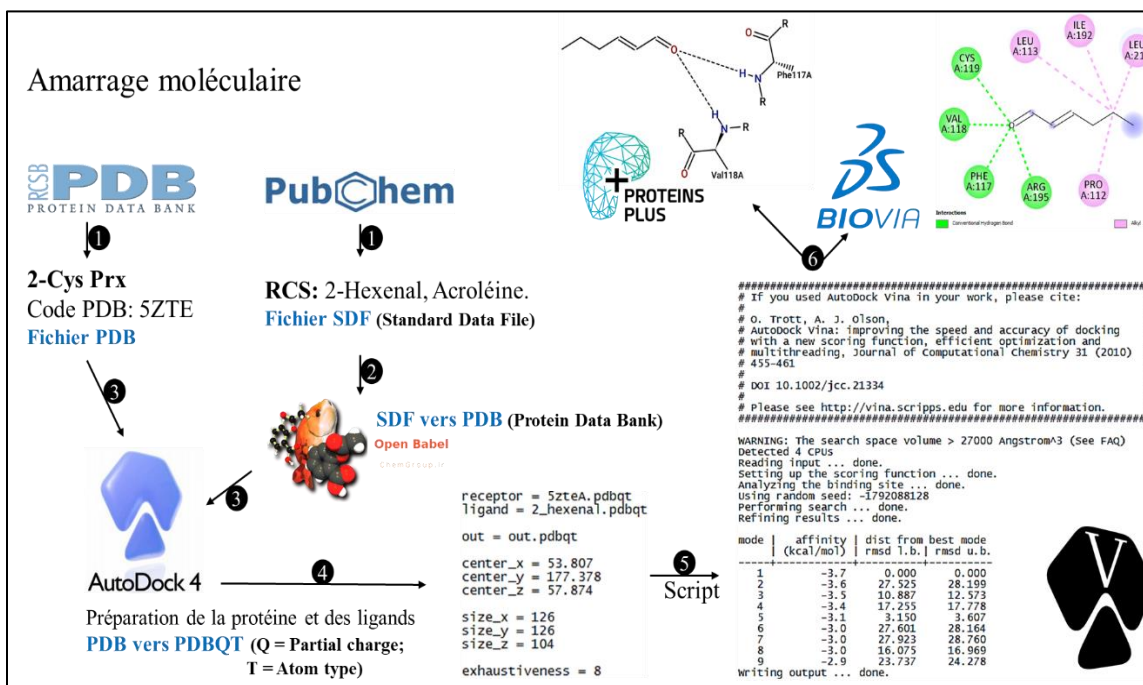


Figure A 5 : Méthode utilisée pour exécuter l'amarrage moléculaire. (1) La structure cristalline au rayon X de la 2-Cys PrxA et les structures 3D du 2-hexenal et de l'acroléine ont été pris dans les bases de données PDB (*Protein Data Bank*) et PubChem, respectivement. (2) Les format SDF (*structural data file*) du 2-hexenal et de l'acroléine ont été convertis en format PDB à l'aide du logiciel Open Babel. (3) La protéine a été préparée à l'aide des outils AutoDock, avec l'ajout d'hydrogènes polaires et le calcul des charges de Gasteiger. Quant aux RCS, les charges d'hydrogènes polaires ont été attribuées, et les hydrogènes non polaires ont été fusionnés. Les composés ont finalement été convertis en format pdbqt dockable pour l'amarrage moléculaire. (4, 5) Pour déterminer les poches de la 2cpA renfermant les résidus sensibles au RCS, un amarrage moléculaire à l'aveugle a été effectué à l'aide du logiciel AutoDock Vina. La grille de la boîte a été définie pour englober la plus grande partie de la structure de la protéine (coordonnées : centres : X = 53,807, Y = 177,378, Z = 57,874, et 126, 126, 104 sur les axes X, Y et Z). (6) Les interactions des structures amarrées ont été examinées à l'aide du serveur ProteinPlus ou du logiciel DSV (*Discovery Studio Visualizer*).

Annexe F : Importance du DTT dans la préparation des échantillons de protéines avant l'induction de la réaction de carbonylation

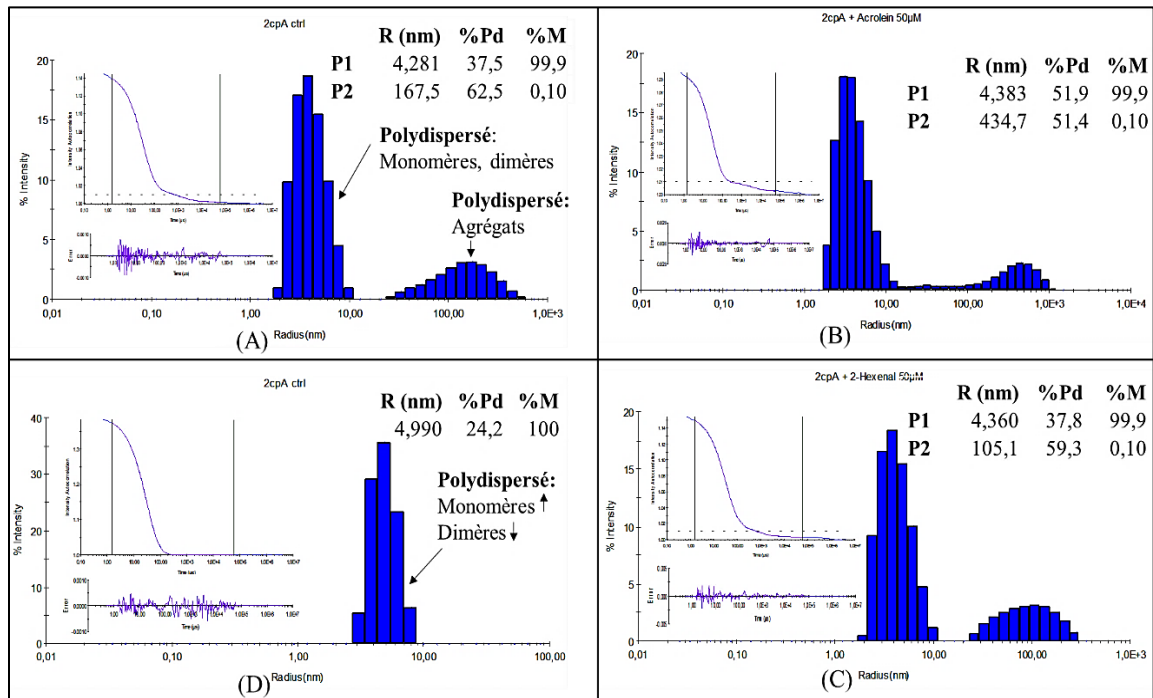


Figure A 6 : Analyse de la distribution de la taille moléculaire de la 2cpA. Dans cet essai, nous avons induit la carbonylation de la 2cpA avec le 2-hexénal et l'acroléine. Après la purification, la protéine n'a pas été réduite avec le DTT, et la réaction de carbonylation a également été effectuée en absence de DTT. Les protéines ont ensuite été diluées à une concentration de 0,5 mg/ml dans du PBS 1X (pH 7,4) pour l'analyse DLS. Les expériences de DLS ont été réalisées en utilisant la « méthode automatique de mesure par lots à température constante », à 25 °C. (A) Résultats de l'analyse de la distribution de la taille moléculaire des protéines dans l'échantillon contrôle. Les résultats montrent deux pics (distribution polymodale) avec des pourcentages de dispersion de 37,5 % et 62,5 % (polydispersité), respectivement. Le rayon hydrodynamique moyen des molécules représentées par le pic 2 est de 167,5 nm, ce qui traduit des agrégats moléculaires. (B, C) Après la carbonylation avec le 2-hexénal et l'acroléine, la distribution est restée polymodale polydisperse, indiquant que la carbonylation n'a pas affecté significativement la distribution de la taille moléculaire des particules dans les échantillons. Pour valider cette observation, nous avons effectué une réduction de l'échantillon contrôle avec 20 mM de DTT pendant 1 h, puis nous l'avons réanalysé au DLS. (D) Après la réduction avec 20 mM de DTT, on obtient une distribution monomodale polydisperse, indiquant que le DTT a décomplexé l'échantillon (pas d'agrégats). Dans la suite des travaux, nous avons toujours effectué une réduction préalable des échantillons de protéines avec du DTT avant d'induire

la réaction de carbonylation. La figure 3.7 (chapitre 3) montre les résultats d'analyse DLS sur des échantillons réduits avant la réaction de carbonylation.

Annexe G : Exemple de résultats de l'analyse de l'effet de la carbonylation sur la stabilité thermique de la 2cpB

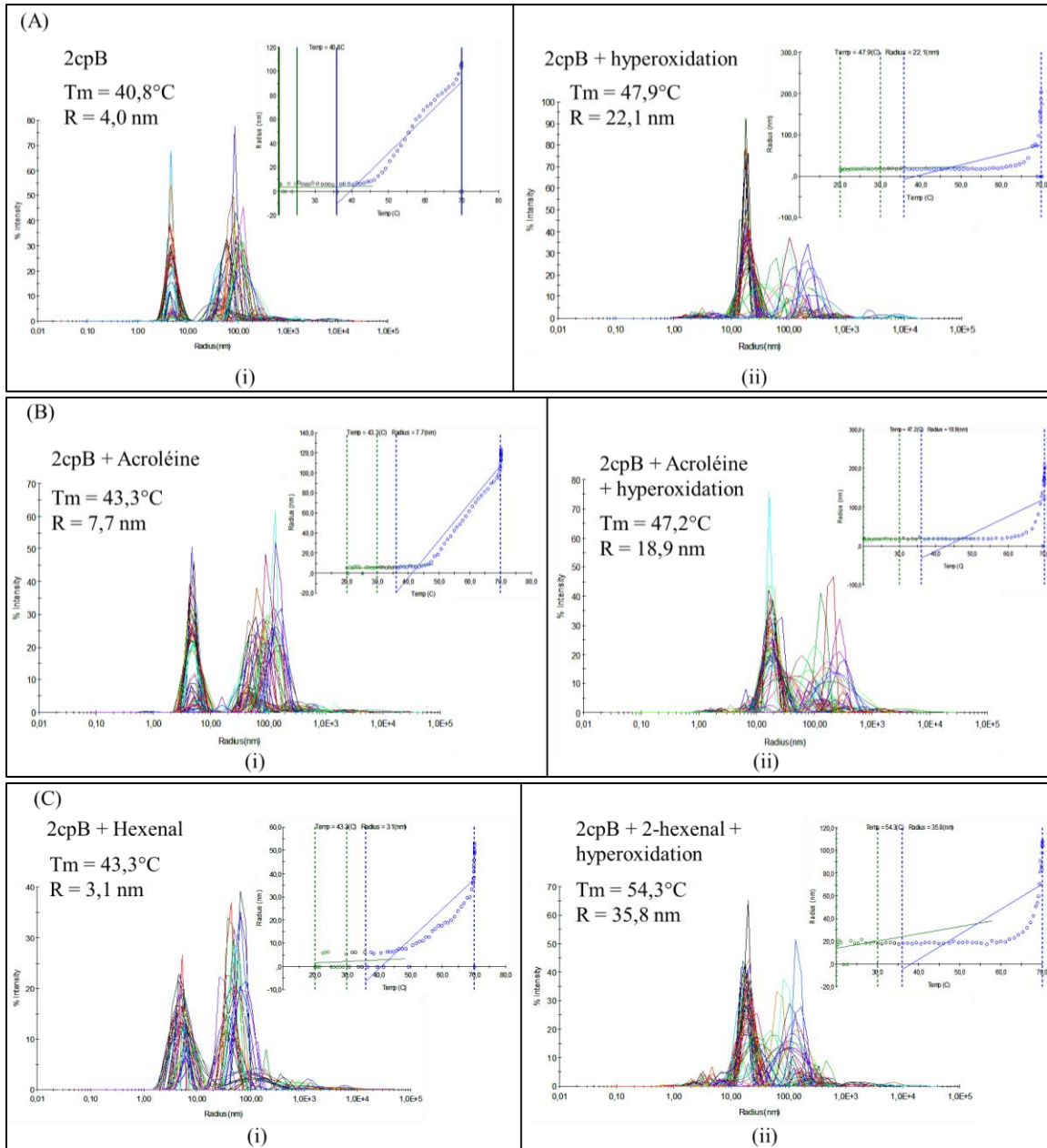
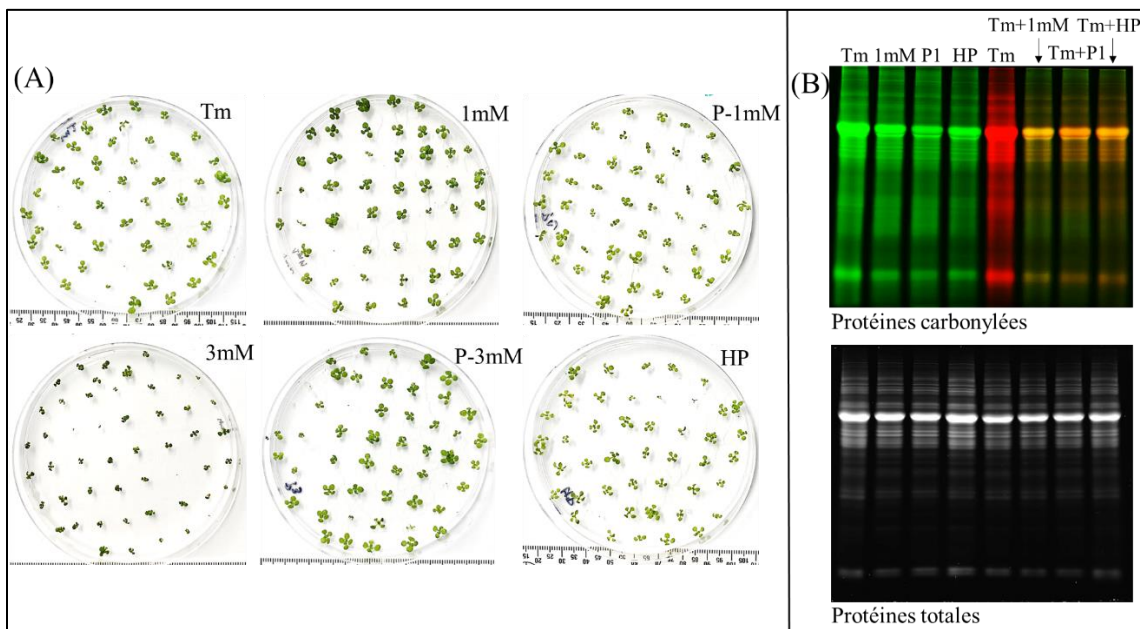


Figure A 7 : Analyse de l'effet de la carbonylation sur la stabilité thermique de la 2cpB. Nous avons utilisé la technique DLS, en conjonction avec la méthode automatique de balayage thermique, avec un incrément de température de 1 °C. Le balayage thermique a été réalisé dans une plage de température allant de 20 à 70 °C sur 0,5 mg/ml d'échantillons

protéiques dans du PBS 1X (pH 7,4). Les résultats montrent que les protéines carbonylées avec le 2-hexéanal et l'acroléine présentent une température moyenne de stabilité thermique (T_m) supérieure à celle des protéines non carbonylées. Cependant, après l'induction de la réaction d'hydroxydation, la protéine carbonylée avec l'acroléine affiche une T_m inférieure de 0,7 °C à celle de la protéine non carbonylée. Pour les figures (A), (B) et (C), (i) représente les résultats de l'analyse des échantillons avant la réaction d'hydroxydation, et (ii) les résultats de l'analyse des échantillons après la réaction d'hydroxydation. Pour chaque image, le graphe de régularisation pour des mesures multiples (rayon hydrodynamique = $f(\text{intensité})$) et le graphe de l'analyse de la dépendance à la température (température = $f(\text{rayon hydrodynamique})$) sont présentés. La T_m de stabilité thermique des échantillons a été déterminée grâce à la méthode linéaire. L'intersection des deux ajustements linéaires est indiquée comme étant le point de transition.

Annexe H : Analyse de l'effet du H_2O_2 -priming sur le profil de carbonylation des protéines chez les semis d'*A. thaliana*



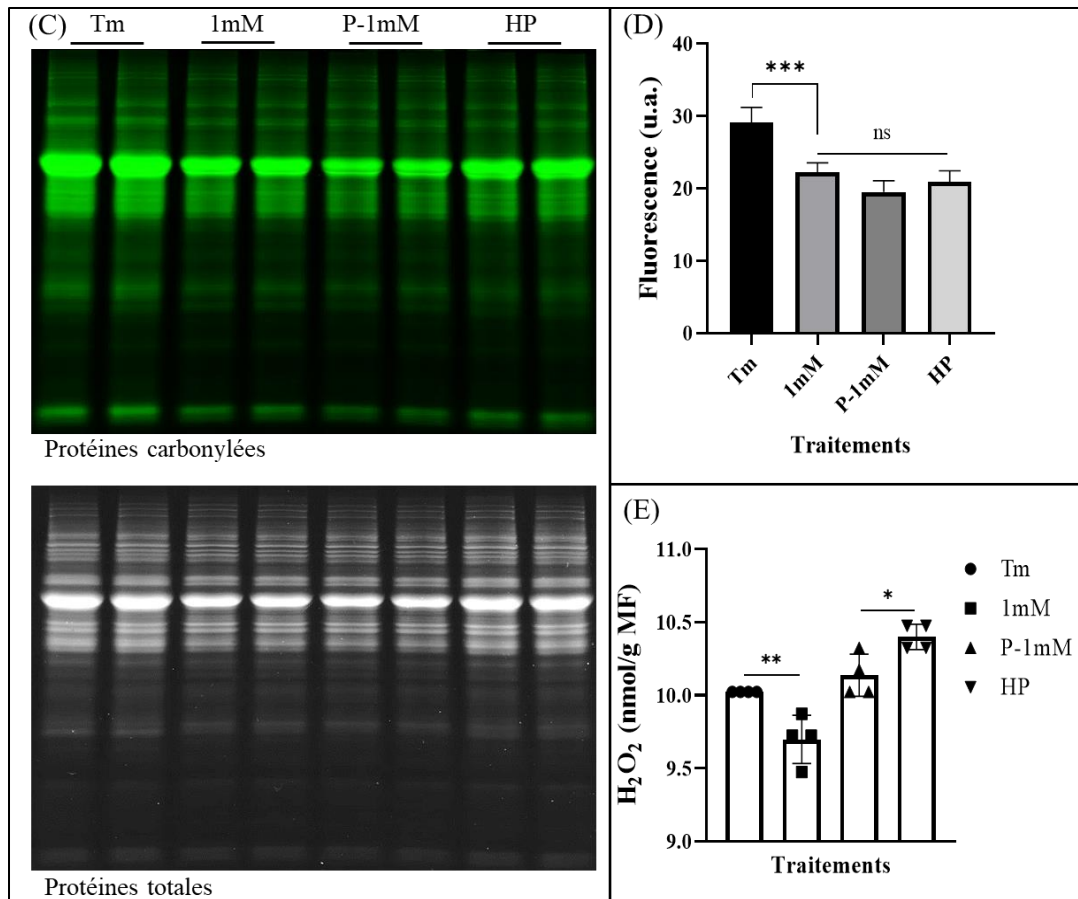


Figure A 8 : Le prétraitement germinatif des graines avec le H₂O₂ (H₂O₂-priming) module la carbonylation des protéines chez les semis d'*A. thaliana*. (A) Les graines ont été trempées dans des solutions de H₂O₂ (1 et 3 mM) pendant 1 h, puis déshydratées sous la hotte jusqu'à l'obtention de leur poids initial. Après le prétraitement germinatif, les graines ont été stérilisées avec de l'éthanol à 70% suivi d'une solution de javel (NaOCl) à 3%, avant d'être ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MS1/2 à raison de 50 graines par boîte. Les graines n'ayant pas subi le H₂O₂-priming ont été mises à germer en condition stressante sur du milieu MS1/2 contenant du H₂O₂ (1 et 3 mM). Les résultats ont montré que le H₂O₂ à 1 mM utilisé en condition stressante n'a pas empêché la formation des semis viables, contrairement au H₂O₂ à 3 mM. Par ailleurs, utilisé pour le prétraitement germinatif, le H₂O₂ n'a pas empêché la formation des semis viables en comparaison au témoin. Le protéome carbonylé des semis viables âgés de 10 jours a ensuite été analysé sur gel de polyacrylamide à 12,5%. Pour cela, les protéines ont été marquées avec les sondes fluorescentes de Cy-Hz. (B) Pour l'analyse comparative du profil de carbonylation des protéines, 5 µg de l'échantillon témoin marqué avec la Cy5.5-Hz a été mélangé avec 5 µg de chacun des échantillons traités marqués à la Cy7.5-Hz et les volumes résultants ont été chargés dans les puits du gel. Après la séparation, le gel a été scanné à deux longueurs d'onde pour la détection des protéines carbonylées ; soit un scan multiplex à 658 et à 784 nm, en associant la couleur rouge à la Cy5.5-Hz et la couleur verte à la Cy7.5-Hz. L'analyse

des résultats a montré que la carbonylation des protéines était plus accentuée dans le témoin par rapport aux traitements (les lignes des mélanges, c'est-à-dire Tm+1mM, Tm+P1 et Tm+HP, tendent vers la couleur rouge, matérialisant ainsi la dominance de la carbonylation des protéines dans l'échantillon témoin par rapport aux échantillons traités). Pour l'analyse des protéines totales, le gel a été scanné à 520 nm en associant la couleur grise à la sonde de fixation AzureRed. (C) Pour la quantification du niveau de carbonylation des protéines, tous les échantillons ont été marqués avec la Cy7.5-Hz. Après la séparation, le gel a été scanné à 784 nm pour les protéines carbonylées, en associant la couleur verte à la Cy7.5-Hz (i), et à 520 nm pour les protéines totales, en associant la couleur grise à la sonde de fixation AzureRed. (D) L'analyse avec le logiciel ImageJ du gel de fluorescence présenté en (B) a permis de déterminer l'intensité de la fluorescence des protéines carbonylées dans chaque échantillon. Les résultats ont montré que les prétraitements germinatifs ont réduit significativement le niveau de carbonylation des protéines chez les semis d'*A. thaliana*, montrant ainsi que le prétraitement germinatif avec le H₂O₂ peut préparer la plante à résister au stress oxydatif durant sa croissance. (E) L'analyse du H₂O₂-intracellulaire a montré que la concentration de cette ERO était plus faible chez les semis ayant germé dans un milieu contenant du H₂O₂ à 1 mM en comparaison au témoin et aux semis ayant subi le priming. Tm : témoin ; 1mM : H₂O₂ à 1 mM ; 3mM : H₂O₂ à 3 mM ; P-1mM : priming avec le H₂O₂ à 1 mM ; P-3 mM : priming avec le H₂O₂ à 3 mM ; HP : hydropriming ou H₂O-priming. Les astérisques dénotent une différence significative, test post hoc de Tukey, ANOVA à un facteur. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 ; ns : non significatif.

Annexe I : Impact de la concentration d'aldéhydes sur l'activité enzymatique de la 2cpA et de la 2cpB.

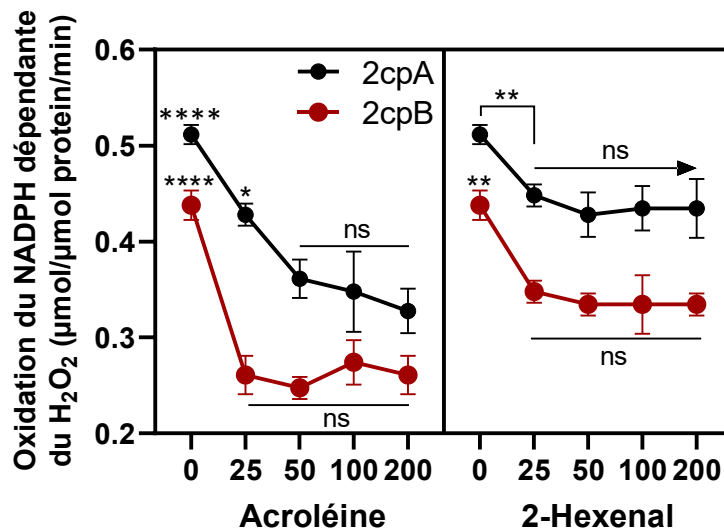


Figure A 9 : Le 2-hexenal et l'acroléine aux concentrations de 25-300 µM provoquent une réduction de l'activité enzymatique spécifique de la 2cpA et de la 2cpB. Les protéines (0,2 µg/µL) ont été incubées pendant 30 min à 30 °C dans du PBS contenant 10 mM d'EDTA,

200 μM de NADPH, 0,25 mM de Trx et 8 μM de TrxR. Ensuite, 25-300 μM de 2-hexenal/acroléine ont été ajoutés dans le milieu, et après 5 min d'incubation, la réaction enzymatique a été déclenchée avec 300 μM de H_2O_2 . Les astérisques dénotent une différence significative, ANOVA à deux facteurs, test post hoc Tukey. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$; ns : non significatif.

Annexe J : Liste des modifications identifiées sur le protéome carbonylé des feuilles d'*A. thaliana*.

Code	Protéines	Numéro d'accèsion	Séquence du peptide	Sites	RCS
ATCG00490	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	O03042	(R)ELGVPIVMHDYLTGGFTANTSLSHYCR(D)	H267	Cinnamaldéhyde
			(R)ELGVPIVMHDYLTGGFTANTSLSHYCR(D)	H267	β-cyclocitral
			(R)ELGVPIVMHDYLTGGFTANTSLSHYCR(D)	H267	4-Hydroxy-2-hexenal
AT4G21640	Subtilisin-like protease SBT3.15	F4JL8	(R)ILKLKTTR(I)	K120	4-Hydroxy-2-hexenal
AT3G46810	Cysteine/Histidin e-rich C1 domain family protein	Q9STF5	(K)LCEACVSQINTDPFYSCELCGFILHQTCANMP RK(K)	C403	Malondialdéhyde (MDA)
AT3G13235	Ubiquitin family protein	F4JC86	(K)HQCTIDLKENVMTVGGGEVSVPFLLQEKDIPS R(F)	H295	β-cyclocitral
AT1G54070	Dormancy-associated protein homolog 4	F4HV65	(R)SIMVTKGNNNVR(G)	K53	Acroléine
AT3G04110	Glutamate receptor	A0A1I9LL K1	(R)VLVTAGNK(V)	K432	Acroléine

Les lettres en rouge désignent les sites de carbonylation identifiés sur les protéines.